

Über den Wirkungsmechanismus der die
Rheumafaktor-Gammaglobulin-Bindung
inhibierenden Faktoren

von

HANS HELMING

München 1964



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus der Medizinischen Poliklinik der Universität München
Direktor: Professor Dr. W. Seitz

Über den Wirkungsmechanismus der die
Rheumafaktor-Gammaglobulin-Bindung inhibierenden Faktoren

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Hans Helming

aus

Neubeckum/Westf.

München 1964



Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Referent: Professor Dr. W. Seitz

Dekan: Professor Dr. R. Bachmann

Tag der mündlichen Prüfung: 14.7.1964

Meinen Eltern in Dankbarkeit gewidmet

Inhaltsverzeichnis

Einleitung	Seite 5
Eigene Untersuchungen . . .	29
Methodik	29
Versuchsanordnungen	32
Tabellen.	34
Fragestellungen	37
Diskussion	62
Zusammenfassung	63
Literaturverzeichnis	65

Einleitung

1922 entdeckte M e y e r (1) bei der Ausführung von Wassermann'schen Reaktionen zwei Seren, die die Fähigkeit hatten, sensibilisierte Hammelblutkörperchen zu agglutinieren. Es handelte sich um eine schwere Lebercirrhose und eine chronische Bronchitis. Gegenüber unsensibilisierten Hammelblutkörperchen zeigten die Seren keine stärkere agglutinierende Wirkung. M e y e r (1) fand, daß die Bindung der "agglutinationsfördernden Substanz" an die nativen Erythrocyten von der Stärke der Sensibilisierung abhängig war. Halbstündiges Erhitzen der Seren bei 56°C hatte keinen Einfluß auf die agglutinationsfördernde Wirkung. Erst durch längeres Erhitzen auf 70°C verloren die Seren diese Eigenschaft. M e y e r (1) sah aber nicht den klinischen Wert dieser seiner Beobachtung.

Erst 1940 erkannte W a a l e r (2), daß bestimmte Polyarthritikerseren die Agglutination von Hammelblutkörperchen nach Zusatz einer bestimmten Menge Kaninchenamboceptor erheblich steigern können. In diesem Zusammenhang sprach W a a l e r (2) von einem agglutinationsfördernden Faktor (AAF). Die in jedem menschlichen Serum vorhandenen heterophilen Haemagglutinine konnten nach seiner Ansicht nicht allein Ursache dieses Phänomens sein, da selbst große Serummengen allein nicht zur Agglutination der Schaferythrocyten führten. W a a l e r (2) fand unter 77 Patienten mit primär chronischer Polyarthrititis (p.c.P.) 27 starke und 50 schwächere Agglutinationsreaktionen. Den agglutinationsfördernden Faktor ordnete er der Gammaglobulinfraktion zu und hielt ihn für thermostabil (halbstündiges Erhitzen bei 56°C). 1948 griffen R o s e und Mitarb. (3) das Problem erneut auf und beschrieben eine Methode, die durch eine bestimmte Versuchsanordnung die Ausschaltung der in jedem menschlichen Serum vorhandenen heterophilen Agglutinine zum Ziele hatte, die normalerweise schon Schaferythrocyten agglutinieren. Vor Ausführung des Tests wurden die Rheumatikerseren durch Erhitzen bei 56°C für die Dauer von 30 Minuten inaktiviert. Serumverdünnungen wurden in doppelter Ausführung in Serien von je 12 Röhrchen hergestellt. Die erste Serie wurde mit 0,5 ml einer 1%igen Suspen-

sion von normalen Schafererythrocyten, die zweite Serie mit einer solchen von sensibilisierten Erythrocyten beschickt. Sämtliche Röhrchen wurden eine Stunde lang in ein Wasserbad von 37°C gebracht und dann über Nacht im Kühlschrank bei 4°C aufbewahrt. Anschließend erfolgte die Ablesung. Der Titer wurde ausgedrückt als Differenz der beiden Einzeltiter. Dieser Differential-Agglutinations-Test (DAT) war als Waaler-Rose-Test früher die übliche Bestimmungsmethode. Die Verwendung von gereinigten Globulinfraktionen von Rheumatikerseren statt Vollseren erbrachte dieselben Ergebnisse. Hohe Differential-Agglutinations-Titer wurden nach R o s e (3) nur bei Seren von Patienten mit aktiver p.c.P. gefunden.

Ein Jahr später berichteten S v a r t z und S c h l o s s m a n n (4) und in Amerika H e l l e r (5) über eine Modifikation des Haemagglutinationstests, der vor Ausführung der Reaktion die Absorption der normalerweise vorkommenden Haemagglutinine durch gewaschene Schafererythrocyten vorsah. So war es nicht mehr notwendig, die Testergebnisse als Differential-Agglutinations-Titer auszudrücken. H e l l e r (5), S v a r t z und S c h l o s s m a n n (4) fanden, daß nach Absorption der unspezifischen Agglutinine nur die Seren von Patienten mit p.c.P. die Eigenschaft behalten, sensibilisierte, d.h. mit Amboceptor beladene Schafererythrocyten zu agglutinieren. Als positives Testergebnis wurde im Allgemeinen ein Titer von 1:64 und höher angesehen. In der Literatur werden für diesen Heller-Svartz-Schlossmann-Test positive Resultate bei sicherer p.c.P. angegeben, die zwischen 40 und 70 % schwanken.

Statt der Hammelblutkörperchen verwendeten S v a r t z und S c h l o s s m a n n (6) sensibilisierte Humanerythrocyten der Blutgruppe ORh-negativ, wobei eine vorangehende Absorption nicht notwendig war, da diese Erythrocyten keine Agglugene enthalten. W a g e r (7) stellte 1950 fest, daß man beim Haemagglutinationstest als Träger auch Erythrocyten von Meerschweinchen und Hühnern verwenden kann, wenn man sie nur vorher mit Kaninchenamboceptor sensibilisiert. Er bestätigte auch die Möglichkeit der Verwendung von sensibilisierten menschlichen Blut-

körperchen der Blutgruppe O. Es war sogar möglich, die eigenen Erythrocyten des Patienten zu verwenden unter der Voraussetzung der Sensibilisierung mit homologem Kaninchenamboceptor.

H e l l e r, und Mitarb. (8) teilten 1952 mit, daß es durch Zusatz von bestimmten Tierserenverdünnungen zum Haemagglutinationssystem zu einer wesentlichen Erhöhung des Agglutinationstiters kommt. Zwei Verdünnungsreihen wurden angesetzt, von denen die eine als Verdünnungsmittel physiologische Kochsalzlösung und die andere eine 5%ige Schafserumverdünnung enthielt. Die erste Reihe diente zur Feststellung des sogenannten Basis-Serum-Titers. Durch Vergleich der beiden Testreihen ergab sich das Ausmaß der Titererhöhungen. Der Test wurde als positiv angesehen, wenn der Titer der Schafserumverdünnungsreihe um das vierfache gegenüber der Kochsalzverdünnungsreihe erhöht war (SEA-Test).

1953 entwickelten S v a r t z und S c h l o s s m a n n (9, 10) den sogenannten Kälteglobulintest. Dieser stellte eine Modifikation des Heller-Svartz-Schlossmann-Tests dar und verwendet eine Teilfraktion des Rheumatikerserums. Die verwendeten Seren wurden 14 mal mit Aqua dest. verdünnt und dann 48 Stunden bei 4°C aufbewahrt. Durch Zentrifugierung gewannen die Autoren ein sogenanntes Kältepräzipitat, das in physiologischer Kochsalzlösung gelöst auf dasselbe Volumen wie das Ausgangsserum gebracht wurde. Unter Verwendung dieser Kältepräzipitatlösung erhielten die Autoren bei 95 von 100 Patienten mit sicherer p.c.P. positive Testergebnisse. Sie folgerten daraus, daß die haemagglutinierende Substanz im Kältepräzipitat von Rheumatikerseren schon einen gewissen Reinheitsgrad erreicht hat.

Später gingen Z i f f und Mitarb. (11) dazu über, den Schaferythrocytentest mit der durch Dialyse gegen verdünnten Phosphat-Citrat-Puffer von pH 5,8 gewonnenen Euglobulinfraktion durchzuführen. Auf diese Weise konnte in fast 92% der Fälle mit p.c.P. ein positiver Agglutinationstiter festgestellt werden. Z i f f (11) vermutete, daß in der Euglobulinfraktion der Polyarthritiseren im Gegensatz zu Gesunden keine inhibitorische Aktivität vorhanden ist.

Zu erwähnen ist noch der sogenannte F-II-Test von H e l l e r

und Mitarb. (12). Zum Test werden mit 1%iger Tanninsäure vorbehandelte Schaferythrocyten statt mit Kaninchenamboceptor mit menschlichem Gammaglobulin der Cohn-Fraktion-II beladen. Von 87 Patienten mit p.c.P. war in 71% der Fälle eine deutliche Agglutination zu verzeichnen. Hierbei wurden zum ersten Mal die Trägersubstanzen, in diesem Fall noch Erythrocyten, mit menschlichem Gammaglobulin beladen; es zeigte sich, daß bei den Agglutinationsreaktionen nur die Beladung respektive die Sensibilisierung der Trägersubstanzen mit Gammaglobulin von Bedeutung ist.

E p s t e i n und Mitarb. (13) arbeiteten einen Präzipitationstest aus, der die alleinige Verwendung einer menschlichen Gammaglobulinlösung vorsieht, die nach Hinzufügung zu hochtitrigen Rheumatikerseren zur Ausfällung eines Präzipitats führt. Für die qualitative Präzipitationsreaktion wird die Gammaglobulinlösung für 10 Minuten bei 63°C im Wasserbad erhitzt, wobei sie in einen aggregierten Zustand übergeht. Diese Methode beweist, daß die Anwesenheit von Trägersubstanzen zur Sichtbarmachung der Reaktion nicht unbedingt erforderlich ist.

Bald folgte die Entdeckung, daß man anstelle der Erythrocyten auch Kunststoffpartikel verschiedenster Art, die mit menschlichem Gammaglobulin der Cohn-Fraktion-II beladen waren, verwenden konnte. Um die Unsicherheitsfaktoren, die der Gebrauch von tierischen Erythrocyten beinhaltet, wie z.B. ihre begrenzte Haltbarkeit und das Auftreten von Titterschwankungen selbst bei Verwendung von Erythrocyten desselben Tieres, zu überwinden, inaugurierten S i n g e r und P l o t z (14) 1956 ihren Latex-Fixationstest. Hierbei werden biologisch inerte Polyvinyltoluene-Latex-Partikel von $0,81\mu$ als Indikator verwendet, nachdem sie vorher mit menschlichem Gammaglobulin der Cohn-Fraktion-II beladen wurden. Wichtig ist auch der Gebrauch einer geeigneten Pufferlösung (z.B. Borat-Puffer oder Glykokoll-NaCl-Puffer) als Verdünnungsmittel. Da ober- und unterhalb eines pH von 8 bis 9 spontane oder unspezifische Agglutinationen auftreten können, hat sich ein pH von 8,2 als optimal erwiesen. Die günstigste Konzentration des Gammaglobulins beträgt 250μ /ml

(0,5%ig). Das Prinzip des Latex-Fixationstests besteht darin, daß die Suspension der mit Cohn-Fraktion-II beladenen Latex-Partikel einer geometrischen Verdünnungsreihe des Patientenserums zugesetzt wird. Bei Anwesenheit des Rheumafaktors im untersuchten Serum kommt es nach einer bestimmten Zeit zu einer Agglutination der Latex-Partikel, die durch kurzfristiges Zentrifugieren der Röhrchen deutlich in Erscheinung tritt. Je nach der Menge des im Patientenserum vorhandenen Rheumafaktors ist die Agglutination bis zu einer mehr oder weniger starken Serumverdünnung nachweisbar. Nach S i n g e r und P l o t z (14) gilt eine Agglutination bei 1:20 und höher als positiv. Unter diesen Kautelen hatten von 150 Patienten mit primär chronischer Polyarthrititis 107 ein positives Testergebnis (71,3%). Von 100 Kontrollpersonen reagierte nur ein Serum positiv.

In der Folgezeit wurden von verschiedensten Autoren Objektträgermethoden entwickelt, die einen schnellen und einfachen Nachweis des Rheumafaktors gestatteten. So gaben S i n g e r und P l o t z (15) 1958 einen Tropfentest an, bei dem dem Serum oder Fingerbeerenblut eine Eosinlösung mit Latex-Partikeln zugefügt wird und die eventuelle Agglutination mit bloßem Auge abgelesen werden kann. Von R h e i n ' s , M c C o y und Mitarb. (16) wurde über einen ähnlichen Test berichtet, wobei eine mit Polio-Immunglobulin versetzte Latex-Suspension dem verdünnten Patientenserum zugesetzt wird. Daraus entstand schließlich der heute sehr verbreitete Latex-Schnelltest bzw. Latex-Tropfentest (RA-Test) (F e l d m a n n und Mitarb. (17)). Bei diesem Test werden handelsübliche Reagentien (Hyland-Laboratories, Los Angeles; Serum-Institut Molter, Heidelberg; Behringwerke Marburg) verwendet, in denen der Latex-Indikator bereits mit Gammaglobulin beladen ist. Zur Durchführung des Latex-Tropfentests wird ein Tropfen eines mit Puffer verdünnten Serums (Verdünnung 1:20) mit einem Tropfen der Latex-Suspension auf einen Objektträger gebracht, die beiden Reaktionsteilnehmer mit einem Glasstab verrührt und anschließend rotierend bewegt. Die Ablesung erfolgt nach zwei Minuten. Je nach Agglutinationsstärke wird das Ergebnis der Reaktion mit Ø bis +++ bezeichnet. Der Prozentsatz der positiven Ergebnisse bei Patienten mit primär chronischer

Polyarthrititis ist bei den einzelnen Autoren sehr unterschiedlich und liegt zwischen 34,7% und 84,6%. Zu erwähnen ist noch eine Modifikation des Latex-Fixationstests von W i e d e r m a n n , E g g h a r d t und B r ä u n s t e i n e r (18), die durch eine hypertone Peristonlösung eine Ausfällung der Euglobuline und Lipoproteine aus dem Rheumatiker Serum vorsieht. Mit dem so erhaltenen Präzipitat wird der Latex-Fixationstest durchgeführt.

Von anderen Autoren wurden weitere Modifikationen des Latex-tests ausgearbeitet. Es erwies sich, daß man die Latexteilchen ohne weiteres z.B. durch Bentonit-Partikel oder Kollodiumteilchen ersetzen kann, wenn man sie vor Gebrauch mit Gammaglobulin der Cohn-Fraktion-II belädt. Der sogenannte Bentonit-Flockungstest stammt von B o z i c e w i c h , B u n i m und Mitarb. (19), bei dem mit Methylenblau gefärbte Bentonit-Partikel als Indikator und Gammaglobulin als Reaktor verwendet werden. Von 41 Patienten mit sicherer primär chronischer Polyarthrititis fanden sie in 32 Fällen (78%) ein positives Ergebnis. Den Beweis, daß man auch mit mit Gammaglobulin beladenen Kollodiumteilchen den Rheumafaktor-Nachweis führen kann, erbrachte Z a v á z a l (20). Er stellte ähnlich wie beim Latex-Fixationstest von S i n g e r und P l o t z (14) eine geometrische Verdünnungsreihe des inaktivierten Patientenserums her und setzte jedem Röhrchen die gleiche Menge einer Kollodiumsuspension zu. Nach einstündiger Inkubation bei Zimmertemperatur wurden die Röhrchen kurzfristig zentrifugiert und das Ergebnis abgelesen. In letzter Zeit konnte W i n b l a d (21) aufzeigen, daß sich auch sensibilisierte Kaolinaufschwemmungen zum Nachweis des Rheumafaktors eignen. Voraussetzung ist die Inaktivierung des Komplements und die Verwendung eines geeigneten Puffers.

Abschließend sei noch über ein Verfahren berichtet, das mittels Streulichtmessung der Grenzschicht zwischen Patientenserum und menschlicher Gammaglobulin-Lösung den Rheumafaktor-Nachweis führt (K l e i n e und Mitarb. (22)). Diese Methode basiert auf der Mitteilung von E p s t e i n und Mitarb. (13), daß im Prinzip die Reaktion zwischen Rheumafaktor und Gammaglobulin auch ohne Zuhilfenahme eines Gammaglobulin-Trägers durchgeführt werden kann. Bei Anwendung eines Überschichtungsver-

fahrens tritt bei Lichtdurchfall durch die Grenzschicht der Lösungen von Gammaglobulin und Patientenserum bei Aggregatbildung eine Änderung der Lichtablenkung gegenüber dem Anfangsstadium ein, die in einer einfachen Meßanordnung zur Bestimmung der Größe und Geschwindigkeit der Grenzschichtreaktion ausgenutzt werden kann. Daß es sich hierbei tatsächlich um eine Aggregation von Gammaglobulin und den im Serum von chronischen Polyarthritikern vorkommenden Rheumafaktor handelt, wird allerdings von den Autoren nur vermutet.

H e l l e r und Mitarb. (12) teilten 1954 mit, daß der Zusatz von bestimmten menschlichen Seren eine Hemmung der Haemagglutination verursacht. Es stellte sich heraus, daß auch aus menschlichem Serum gewonnene Cohn-Fraktion-II eine ähnliche inhibitorische Aktivität entwickelt, wenn sie zum Testansatz hinzugefügt wird. H e l l e r (12) vermutete, daß die Cohn-Fraktion-II, was die Affinität zum Rheumafaktor betrifft, sich in Konkurrenz mit den sensibilisierten Hammelblutkörperchen befindet, und daß eine Inhibition nur deshalb auftritt, weil die Cohn-Fraktion-II eine größere Affinität zum Rheumafaktor hat als die sensibilisierten Hammelblutkörperchen.

Die Tatsache, daß bei einem hohen Prozentsatz der Patienten mit primär chronischer Polyarthrititis der Nachweis des Rheumafaktors mit Hilfe eines Haemagglutinationssystems nicht gelingt, ließ Z i f f und Mitarb. (11) vermuten, daß in diesen Seren ein Inhibitor vorhanden ist, der für den negativen Testausfall verantwortlich ist. In der Folge zeigte sich, daß manche Vollseren von Patienten mit nicht rheumatischen Krankheiten die Fähigkeit haben, die Agglutination der sensibilisierten Hammelblutkörperchen zu hemmen. Die folgenden Untersuchungen hatten zum Ziel, durch Trennung des Inhibitors vom "agglutinierenden Faktor" eine Steigerung der Empfindlichkeit der Agglutinationsreaktion zu erreichen. Durch Ausfällung der Euglobulinfraktion von Patienten mit primär chronischer Polyarthrititis konnte tatsächlich eine teilweise Trennung erzielt werden, in der Form, daß die Euglobulinüberstände inhibitorische Aktivität ent-

wickelten, während die Euglobulinfraktionen selbst nur agglutinierende Aktivität zeigten. Umgekehrt ergab sich, daß bei rheumafaktor-negativen Seren Gesunder sowohl die Euglobulinfraktionen selbst als auch deren Überstände deutliche inhibitorische Fähigkeit aufwiesen. Diese Phänomene nutzte Z i f f (11) einmal zu einer Modifikation des Haemagglutinationstests, indem er anstelle des Vollserums die Euglobulinfraktion benutzte. Unter dieser Voraussetzung ergab sich bei 108 Patienten mit p.c.F. in nahezu 90% der Fälle ein positives Testergebnis. Allerdings benutzten die Autoren dabei Hammelblutkörperchen, die stärker als bisher mit Kaninchenamboceptor sensibilisiert waren. Der zweite Test, der auf den oben beschriebenen Versuchsergebnissen basiert, ist der sogenannte Euglobulin-Inhibitionstest. Die zur Durchführung des Tests benötigte Euglobulinfraktion wurde durch Dialyse des mit gewaschenen Hammelblutkörperchen absorbierten Serums gegen verdünnten Citrat-Phosphat-Puffer in der Kälte gewonnen. Das dabei entstehende Präzipitat wird eine halbe Stunde zentrifugiert und anschließend mit eiskaltem Neutralpuffer gewaschen. Der Bodensatz wird in einer der Ausgangsmenge des Serums entsprechenden Neutralpufferlösung aufgelöst. Das Testverfahren wird im Prinzip wie folgt durchgeführt: Serienverdünnungen der Euglobulinfraktion (beginnend mit 1:14, 1:28 etc.), in der man das Vorhandensein oder das Fehlen einer inhibitorischen Aktivität nachweisen will, werden mit einer in jedem Röhrchen konstanten Menge an bekannt positivem Rheumatikerserum in einer bestimmten Verdünnung zusammengebracht. Jedes Röhrchen enthält außerdem eine festgesetzte Menge einer Suspension von sensibilisierten Schafer erythrocyten. Zwei Kontrollröhrchen werden in jeden Versuch eingeschlossen, von denen das eine nur sensibilisierte Hammelblutkörperchen und physiologische Kochsalzlösung und das andere außerdem noch verdünntes Rheumatikerserum enthält. Die Verdünnungsreihen werden über Nacht im Kühlschrank aufbewahrt. Beim Ablesen der Ergebnisse wird der Inhibitionstiter ausgedrückt als die stärkste Verdünnung des Euglobulins, in deren Gegenwart es noch nicht zu einer Agglutination kommt. Inhibition wird als vorhanden registriert, wenn sie bei einer Euglobulinverdünnung von 1:14 festgestellt wird.

Fehlende Inhibition bedeutete einen positiven Testausfall, d.h. durch Fehlen der inhibitorischen Aktivität der Euglobulinfraktion eines untersuchten Serums wird indirekt der Nachweis des Rheumafaktors geführt. Umgekehrt konnte man bei vorhandener Inhibition zumindestens serologisch das Vorkommen des Rheumafaktors mit einer gewissen Sicherheit ausschließen. Z i f f (11) stellte fest, daß sein Inhibitionstest bei ca. 98% der Patienten mit primär chronischer Polyarthrititis positive Ergebnisse lieferte, während die Euglobulinfraktionen der Kontrollpersonen in 96% der Fälle eine sichtbare Inhibition verursachten. M i e h l k e und P u t t n i n s (23) erzielten bei Nachuntersuchungen mit dem Ziff'schen Inhibitionstest positive Ergebnisse in 94,5% der Fälle (untersucht wurden 55 Seren von Patienten mit sicherer primär chronischer Polyarthrititis).

Neuere Untersuchungen über den Haemagglutinations-Inhibitions-Test stammen von S c h i e r z (24), der in Abweichung von Z i f f (11) aus dem zu testenden Serum ein Präzipitat mit Ammoniumsulfat ausfällt, von dem dann eine Verdünnungsreihe (1:8 bis 1:1024) hergestellt wird. In einem Kontrollröhrchen wird die Serumfraktion durch Kochsalzlösung ersetzt. Dieser Testansatz gibt ein Bild von der Agglutinationsstärke des RF-haltigen Serums und ermöglicht es, den Einfluß der zu testenden Fraktion auf das agglutinierende System durch Vergleich zu beurteilen. S c h i e r z (24) verwendet außerdem in Abweichung von Z i f f (11) eine höhere Konzentration des bekannt positiven Rheumatikerserums, was natürlich für die Messung der Inhibitionswirkung des zu testenden Serums von erheblicher Bedeutung ist. Außerdem spielt nach S c h i e r z (24) die Konzentration des Amboceptor-Serums zur Sensibilisierung der Erythrocyten eine wichtige Rolle. Nach demselben Autor bedingt die Verwendung eines höher konzentrierten Rheumatikerserums eine Herabsetzung der Empfindlichkeit, erhöht aber die Spezifität des Haemagglutination-Inhibitions-Tests. Unter diesen Voraussetzungen fand der Untersucher bei 50 Fällen mit primär chronischer Polyarthrititis in 74,1% der Patienten positive Ergebnisse gegenüber 58,6% beim Latex-Tropfentest und 48,3% beim Haemagglutinationstest.

Hall, Medins und Bayles (25) modifizierten den Inhibitionstest derart, daß sie die bisher üblichen sensibilisierten Hammelblutkörperchen durch mit Cohn-Fraktion-II beladene Latex-Partikel ersetzten. Dieser sogenannte Latex-Euglobulin-Hemmungstest wurde also in Verbindung mit dem von Singer und Plotz (14) entwickelten Latex-Fixationstest durchgeführt. Die Autoren berichten über positive Resultate in 99% der Fälle (untersucht wurden 177 Patienten mit primär chronischer Polyarthritits). Die Quote der falsch positiven Ergebnisse lag bei 5%. Mit dem Ziel, die methodischen Schwierigkeiten zu vereinfachen, die die Euglobulinfällung mit sich bringt, entwickelten Deicher und Mitarb. (26) einen einfachen Latex-Hemmungstest. Das Prinzip dieses Tests besteht in folgendem: Die Reaktion einer konstanten Menge Rheumafaktor, die in einer bestimmten Verdünnung eines bekannt positiven Rheumatikerserums (Referenzserum) enthalten ist, mit durch Cohn-Fraktion-II sensibilisierten Latex-Partikeln wird von einer geometrischen Verdünnungsreihe (1:4.....1:128) des zu testenden Serums bis zu einer bestimmten Serumverdünnung gehemmt. Die Inhibition bleibt aus, wenn das zu untersuchende Serum selbst den Rheumafaktor enthält, bzw. einen verminderten Gehalt an Inhibitor besitzt. Anstelle der bisher üblichen Euglobulinfraktion wird also das frische Vollserum benutzt, was natürlich die Methodik wesentlich vereinfacht. Das Vollserum wird nicht inaktiviert, da nach Deicher (26) hierbei der sogenannte Λ_2 -Inhibitor seine Wirkung verliert. Vor Ausführung des Tests ist die genaue Feststellung der Agglutinationseinheiten (AE) des Referenzserums mit dem Latex-Fixationstest notwendig. Eine AE ist definiert als 1 ml einer Serumverdünnung, die gerade noch eine einwandfreie positive Agglutination erkennen läßt. Pro Röhrchen werden 3 AE benötigt. Um eine möglichst weitgehende Konstanz der Ergebnisse im Hemmungstest zu erzielen, empfehlen die Autoren die Verwendung einiger weniger rheumafaktor-positiver Seren als Referenzseren. Nach Deicher und Mitarb. (26) hat sich folgende Beurteilung der Testergebnisse bewährt: Hemmung bis zu einer Verdünnung bis 1:32 wird als negativ bezeichnet (kein Rheumafaktor nachweisbar), ebenso Hemmung bis

1:16, wenn die folgenden Röhrchen noch Teilhemmung zeigen. Deutliche Agglutination ab 1:32 und darunter gilt als positiv (Rheumafaktor vorhanden). D e i c h e r und Mitarb. (26) teilten ihre Patienten nach den Kriterien der American Rheumatism Association ein und fanden bei 87 Patienten mit primär chronischer Polyarthrititis mit positivem Agglutinationstest in 97,8% ein positives Ergebnis. Von 26 serologisch negativen, aber klinisch sicheren Polyarthritiden zeigten 76,9% einen sicher positiven und 19,3% einen schwach positiven Hemmungstest. Von 100 Normalpersonen war nur einer positiv, während die "falschpositive" Quote unter 56 Patienten mit den verschiedensten Krankheiten 3,6% betrug.

In letzter Zeit wurde von E r n s t (27) über eine weitere Modifikation des Latex-Inhibitionstests berichtet. Sie unterscheidet sich von dem von Z i f f (11) und H a l l (25) beschriebenen Test im wesentlichen darin, daß anstelle des umständlichen und zeitraubenden Dialysierverfahrens die Periston-Kollidon-Fällung nach W i e d e r m a n n und Mitarb. (18) zur Gewinnung der Euglobulinfraktion herangezogen wird. Für den Hauptversuch werden 1 ml des zu untersuchenden, frischen Patientenserums mit 1 ml Kollidon durchgeschüttelt, die Mischung zentrifugiert und nach Abpipettierung des Überstandes 2,5 ml Borat-Puffer hinzugegeben, um so eine homogene Lösung herzustellen. In drei Röhrchen wird eine geometrische Verdünnungsreihe dieser Lösung hergestellt. Dazu wird in jedes Röhrchen 0,5 ml einer bestimmten Referenz-Serumverdünnung und 1 ml Latexsuspension gegeben. Die Röhrchen werden zwei Stunden im Wasserbad bei 56°C aufbewahrt und anschließend zentrifugiert. Die Reaktion ist positiv, wenn in allen drei Röhrchen eine deutliche Flockung sichtbar ist. Negativ ist der Test, wenn im ersten und zweiten Röhrchen die Agglutination ausbleibt. Der Untersucher führte den Inhibitionstest nur bei Patienten durch, die im Latex-Fixationstest bzw. Latex-Tropfentest einen negativen Testausfall zeigten. Unter dieser Voraussetzung fanden sich bei 188 Fällen mit gesicherter p.c.P. bei 61,1% der Fälle positive Resultate. Unter 58 Gesunden war der Inhibitionstest in 5,1% der Fälle positiv.

Abschließend sei eine Modifikation des Inhibitionstests von M a t h i e s und Mitarb. (27) erwähnt, bei der dieser in Verbindung mit dem Latex-Tropfentest durchgeführt wird. Von dem zu untersuchenden inaktivierten Vollserum wird eine geometrische Verdünnungsreihe mit Pufferlösung hergestellt (1:1 bis 1:16). Von den verschiedenen Verdünnungen werden je eine bestimmte Menge mit einer Latexsuspension auf einen geschwärzten Objektträger gegeben und eine Standard-Referenzserum-Verdünnung hinzugefügt. Der Inhibitionstest ist positiv, wenn die Agglutination der mit Gammaglobulin beladenen Latex-Partikel durch Verdünnungen des zu untersuchenden Serums von 1:8 und darunter nicht verhindert wird. Der Test ist negativ, wenn bei einer Verdünnung von 1:8 und darunter die Agglutination der Latex-Partikel ausbleibt.

Die Bezeichnung Rheumafaktor (RF) ist heute für die Kennzeichnung eines für die primär chronische Polyarthritidis charakteristischen Eiweißkörpers gebräuchlich, der zur Gruppe der makromolekularen Gammaglobuline gehört und für eine große Anzahl von Agglutinations- und Präzipitationsreaktionen verantwortlich gemacht wird. Die serologische Aktivität des RF beruht auf seiner Fähigkeit, mit Gammaglobulin zu reagieren (M ü l l e r - E b e r h a r d (31)).

Wenn auch der Begriff RF erst viel später geprägt und näher charakterisiert wurde, so legte doch schon M e y e r (1) 1922 den Grundstein für die spätere Entwicklung der serologischen Rheumadiagnostik, die naturgemäß eng mit der Erforschung der Natur als auch der Bedeutung des sogenannten RF verknüpft ist. Bei der Ausführung von Wassermann'schen Reaktionen begegneten M e y e r (1) zwei Seren, die die Fähigkeit hatten, sensibilisierte Hammelblutkörperchen zu agglutinieren. Normale Hammelblutkörperchen wurden von diesen Seren nicht beeinflusst. Diese Agglutinationsphänomene schrieb M e y e r (1) einer sogenannten agglutinationsfördernden Wirkung zu, die auch durch

halbstündiges Erhitzen auf 56°C nicht aufgehoben wurde.

M e y e r (1) ging noch einen Schritt weiter. Bei Fraktionierung der Seren durch Einleiten von CO_2 erwiesen sich das gelöste Sediment und der Überstand als gleich wirksam. Die agglutinationsfördernde Wirkung ordnete er sowohl der Globulin- als auch der Albuminfraktion zu. 1940 beschrieb W a a l e r (2) die Agglutination sensibilisierter Hammelblutkörperchen durch Rheumatikerseren und erkannte somit den Zusammenhang dieses serologischen Phänomens mit der chronischen Polyarthrit. W a a l e r (2) sprach in diesem Zusammenhang von einem agglutinationsfördernden Faktor (AAF). Nach Serumfraktionierung erwies sich auch die Gammaglobulinfraktion mancher Rheumatikerseren befähigt, die beobachtete Agglutinationsreaktion auszulösen, während die Albuminfraktion inaktiv war. Diese Beobachtung steht im Gegensatz zu M e y e r (1), der beide Fraktionen für serologisch aktiv hielt. R o s e , R a g a n , F e a r c e und L i p m a n (3) stellten im Rahmen ihrer Mitteilung über den Differential-Agglutinations-Test (DAT) fest, daß mit elektrophoretisch getrennten Beta-Gamma-Globulinen von Rheumatikerseren dieselben Agglutinationstiters erzielt werden konnten, wie bei der Verwendung von Vollseren. 1955 fanden H e l l e r und Mitarb. (29), daß nach Fraktionierung von Rheumatikerseren mit der Cohn'schen Äthanol-Methode allein die Fraktion III, die Beta-Lipoprotein, Alpha- und Gamma-Globulin enthält, in der Lage ist, serologische Aktivität zu zeigen. Der für die Agglutination verantwortliche Faktor schien also schon in konzentrierterer Form vorzuliegen. Durch einfache Verdünnung des Rheumatikerserums mit destilliertem Wasser in der Kälte bei 4°C konnten S v a r t z und S c h l o s s m a n n (9, 10) ein sogenanntes Kältepräzipitat gewinnen, bei dessen Verwendung im Haemagglutinationstest sie in 95% der Fälle positive Resultate erzielten. Die Autoren glaubten, daß mit dieser Methode schon ein gewisser Reinheitsgrad der haemagglutinierenden Substanz erreicht war. Z i f f und Mitarb. (11) führten 1956 die Verwendung der durch Dialyse gegen Citrat-Phosphat-Puffer gewonnenen wasserunlöslichen Eoglobulinfraktion ein. Die mit dieser Fraktion im Haemaggluti-

nationstest erzielte Erfolgsquote von 92% schrieben die Verfasser allerdings dem Umstand zu, daß durch die Euglobulinfraktionierung ein Teil der sogenannten Inhibitoren im Überstand zurückbleibt. Mit dem Kältepräzipitat konnten die Autoren (9, 10) jedoch nur in 75% der Fälle positive Resultate erzielen. Durch Untersuchung von zoneelektrophoretischen Serumfraktionen konnte die serologische Aktivität bestimmter Rheumatikerseren ausschließlich im Bereich der schnellwandernden γ_1 -Globuline nachgewiesen werden (10). S v a r t z und S c h l o s s m a n n (10) benutzten zu dieser elektrophoretischen Isolierung das Kältepräzipitat, konnten aber auf diese Weise keinen höheren Reinheitsgrad erzielen. So blieb noch zu klären, welcher Unterfraktion der komplexen Gammaglobulinfraktion der sogenannte RF zuzuordnen ist.

Eine weitere Klärung des Problems erbrachten Untersuchungen, in denen die präparative Zoneelektrophorese mit analytischer und präparativer Ultrazentrifugation kombiniert wurde. Mit dieser Methode konnten M ü l l e r - E b e r h a r d, K u n k e l und F r a n k l i n (30, 31) in der Gammaglobulinfraktion von Normalpersonen eine schnell und eine langsam sedimentierende Komponente feststellen. Die schnelle Komponente hatte eine Sedimentationskonstante von 19-Svedberg-Einheiten und ein Molekulargewicht von ca. 1000000. Die langsamere Komponente besaß eine Sedimentationskonstante von 7-S mit einem Molekulargewicht von etwa 160000. Der Anteil der schweren 19-S-Komponente betrug ca. 5-10% des normalen Gammaglobulins. Außerdem fand man, daß der Kohlenhydratgehalt des 19-S-Makroglobulins fünf mal so hoch war wie der des leichten 7-S-Anteils. Bei der ultrazentrifugalen Untersuchung der Gammaglobulinfraktion von Patienten mit primär chronischer Polyarthritits wurde neben der bekannten 19-S-Komponente eine weitere entdeckt, die noch schneller als das 19-S-Globulin sedimentierte und zwar mit einer Sedimentationskonstante von 22-S (32, 33). Diese Komponente war im Normalserum nicht feststellbar und fand sich in etwa ein Drittel der untersuchten Rheumatikerseren, die vornehmlich hohe Agglutinationstiter hatten. Die Untersucher glaubten, daß diese annormale Komponente in

engem Zusammenhang mit den Agglutinations- und Präzipitationsphänomenen von Rheumatikerseren stand. Die Menge des 22-S-Materials schwankte bei den untersuchten Seren zwischen 75 und 350 mg% und befand sich in einer befriedigenden Korrelation zum Ausfall des Schafzell-, Latex-Fixations- und F-II-Präzipitationstest. Durch wiederholte Absorption der Seren mit aggregiertem Gammaglobulin kam es zum Abfall des 22-S-Materials und zum Verlust der biologischen Aktivität im überstehenden Serum. Bei der Dichtegradienten-Zentrifugation von Vollseren, die zur Trennung der schweren von den leichten Gammaglobulin-Molekülen führte, zeigte es sich, daß die serologische Aktivität in erster Linie in den Bodenfraktionen, die hauptsächlich 19-S-Moleküle enthielten, zu finden war (33). Im Laufe ihrer Untersuchungen fanden Franklin und Mitarb. (32, 33), daß es möglich war, mit Hilfe von 3-6-molarer Harnstofflösung oder Glykokoll-Puffer mit einem pH von 3 die 22-S-Komponente in die zwei schon bekannten 7-S- und 19-S-Anteile zu dissoziieren. Das Verschwinden des 22-S-Anteils und das gleichzeitige Ansteigen der 19- und 7-S-Komponenten war ein Beweis für das gelungene Dissoziationsexperiment. Das Mengenverhältnis der beiden Gammaglobulinarten in der 22-S-Komponente entsprach etwa dem Verhältnis von einem Molekül 19-S-Gammaglobulin zu sieben Molekülen 7-S-Gammaglobulin (31). Es zeigte sich, daß nur die 19-S-Komponente serologisch aktiv war, während der 7-S-Anteil inaktiv war. Durch Dichtegradienten-Zentrifugation von mit Harnstoff behandelten Cohn-Fraktion-II-Präzipitaten, die durch Reaktion mit dem Rheumafaktor entstanden waren, konnten nach Entfernung eines großen Anteils von 7-S-Globulinen lösliche 19-S-Fraktionen gewonnen werden, die serologisch starke Agglutinationsaktivität besaßen. Diese Experimente legen nahe, daß der wahre Rheumafaktor ein 19-S-Makroglobulin ist, aber in vivo in erster Linie als zirkulierender Komplex in Form der 22-S-Komponente existiert (31). Das Vorkommen dieser Komponente in nur einer begrenzten Anzahl von Rheumatikerseren mit positiven Agglutinationstesten erklärt Müller-Eberhard (31) mit der relativ geringen Empfindlichkeit der Ultrazentrifuge, die nicht in der Lage sei, geringe 22-S-Mengen zu erfassen, wenn sie eine bestimmte Kon-

zentration unterschreiten.

Später entdeckte K u n k e l (34) bei der Ultrazentrifugenuntersuchung einiger Polyarthritikerseren neben der 19-S- und 7-S-Komponente auch sogenannte Zwischenkomplexe mit einer Sedimentationskonstante von 10 bis 15 S, die mit Säure dissoziierbar waren. Nach Dichtegradientenzentrifugation wurde die serologische Aktivität sowohl in den Zwischenkomplexen als auch in der 7-S-Komponente festgestellt. Nach dieser Untersuchung erscheint es möglich, daß in einigen Fällen auch ein 7-S-Rheumafaktor existiert, der mit anderen 7-S-Gammaglobulin-Molekülen eine Bindung eingeht, die zur Entstehung der sogenannten Zwischenkomplexe führt. Es könnte hier also ein ähnlicher Mechanismus vorliegen, wie er auch für die Bildung der 22-S-Komponente diskutiert wird.

S v a r t z und S c h l o s s m a n n (10, 35) konnten ebenso wie die Untersuchungsgruppe in Amerika feststellen, daß der Rheumafaktor an ein Makroglobulin mit der Sedimentationskonstante von 19-S (genau 18,7) gebunden ist und eine Proportionalität zwischen der Quantität an 19-S-Globulin und der Agglutinationsstärke der Rheumatikerseren vorliegt. Auch wird in seltenen Fällen über das Vorkommen einer 21-23-S-Komponente berichtet, der die Autoren aber keine Bedeutung beimessen. S v a r t z und S c h l o s s m a n n (35) entdeckten, daß beim Versuch der Spaltung der RF-Makroglobuline durch Ammoniumsulfat in einer Konzentration von 1,23 mol die haemagglutinierende Wirkung nicht verloren ging, obwohl die Sedimentationskonstante zwischen 14 und 16 Svedberg-Einheiten lag. Dieselben Autoren (10) versuchten auch mit der Chromatographie unter Verwendung des Kationen-Austausches Caboxycellulose einen Fortschritt zu erzielen. Von den einzelnen aus dem Kältepräzipitat gewonnenen Fraktionen wurde die zur weiteren Behandlung in der Ultrazentrifuge ausgewählt, die den höchsten Haemagglutinationstiter im modifizierten Waaler-Rose-Test aufwies. Nach Ultrazentrifugation trat ein homogener Gipfel auf, der der 19-S-Komponente entsprach. Auch diese Fraktion löste einen positiven Agglutinationstiter aus und zwar mit derselben Titerhöhe wie das Original-Serum. Weiter machten die Autoren den Versuch, durch

kolorimetrische Kohlenhydrat-Analysen und papierchromatographische Aminosäurenauftrennung den 19-S-Rheumafaktor näher zu charakterisieren bzw. festzustellen, was ihn vom physiologisch vorkommenden 19-S-Makroglobulin unterscheidet. Auch dieser Weg führte nicht weiter, denn die beiden Makroglobuline zeigten denselben Kohlenhydrat-Anteil von ca. 9%. Auch das Aminosäurendiagramm ließ keinen Schluß auf eine unterschiedliche Struktur zu. Die Verfasser vertraten die Hypothese, daß in den 19-S-Makroglobulin-Molekülen eine verschiedene Gruppierung dieser Aminosäuren vorliege (10). Auch W ö h l e r , M ü l l e r und H o f m a n n (36) konnten keinen wesentlichen Unterschied zwischen der Kohlenhydratzusammensetzung des 19-S-Rheumafaktors und derjenigen der physiologischen 19-S-Gammaglobulinfraktion feststellen. Der angegebene Wert für den Kohlenhydrat-Anteil lag mit 10,78% über dem von S v ä r t z und S c h l o s s - m a n n (10) angegebenen. Der bisher einzige aber entscheidende Unterschied besteht in der Aktivität des Rheumafaktors, also in seiner Fähigkeit, mit Gammaglobulin zu reagieren, welche dem normalen 19-S-Gammaglobulin fehlt. Nach M ü l l e r - E b e r - h a r d (31) muß dieser funktionelle Unterschied ein physikochemisches Korrelat haben.

Nach neueren immunoelektrophoretischen Untersuchungen von B e h r e n d und C l e v e (37) ist in dem β_2 -Makroglobulin wahrscheinlich das Korrelat des agglutinierenden Serumfaktors zu sehen. Durch wiederholtes Zentrifugieren von Rheumatikerseren konnte ein Makroglobulin-Präparat gewonnen werden, in dem die serologische Aktivität um das Zwei- bzw. Vierfache gesteigert war. Eine eindeutige Parallelität zwischen der Ausbildung des β_2 -Makroglobulin-Präzipitates und der serologischen Aktivität im Agglutinationstest bestand nicht. Die Untersucher fanden das auch im Normalserum vorkommende β_2 -Makroglobulin bei Patienten mit p.c.P. stets vermehrt. Mit der Doppeldiffusionstechnik nach Ouchterlony führte I m r e (38) semiquantitative Bestimmungen der RF-Makroglobuline durch. Die β_2 -Makroglobulinvermehrung wurde mit dem Agglutinationsgrad des Rheumafaktors im Latex-Tropfentest in Beziehung gesetzt. Auch dieser Untersucher fand keine absolute Parallelität. Diese

Befunde sind wegen der angenommenen Lokalisation des RF im β_2 -Makroglobulinbereich von Bedeutung.

M a t h i e s und I m r e (39, 40) beschrieben eine Methodik zur Isolierung des Rheumafaktors, die im Prinzip auf der Absprengung des vorher aus Rheumatikerserum an mit Gammaglobulin (Cohn-Fraktion-II) beladene Latex-Partikel gebundenen Rheumafaktors durch Erwärmen beruht. Es gelang, den RF ohne wesentlichen Verlust in eine Pufferlösung zu überführen. Mit diesem isolierten RF wurden immunologische Untersuchungen zur Klärung seiner Antigeneigenschaften durchgeführt. Neben kommerziellem spezifischen Antiserum stand auch ein RF-Antiserum zur Verfügung, das durch Immunisierung von Kaninchen mit isoliertem RF gewonnen wurde. Rheumatikerseren und Normalseren dienten als Vergleich. Nach den Untersuchungen ist zu vermuten, daß der RF gegenüber dem normalen β_2 -Makroglobulin eine geringere Diffusionsgeschwindigkeit aufweist, die ihre Ursache in einer Änderung des Molekulargewichts und der Struktur haben könnte. Die Untersucher bestätigten die bisherigen Befunde, daß der RF keine Antigenspezifität besitzt und daß er ein β_2 -Makroglobulin (19-S) darstellt.

Grundsätzlich sind nun zwei verschiedene Reaktionsarten des 19-S-Rheumafaktors mit Gammaglobulin zu unterscheiden (31). Einmal die Reaktion des Rheumafaktors mit dem 7-S-Gammaglobulin, die einen löslichen Komplex, nämlich die 22-S-Komponente ergibt. Diese Bindung ist reversibel wie die Dissoziierungsexperimente von M ü l l e r - E b e r h a r d (31) gezeigt haben. Nach Vorstellung dieses Autors (31) stehen die gebundenen mit den freien 7-S-Molekülen im Gleichgewicht. Die andere Reaktionsform des Rheumafaktors führt durch Zugabe bestimmter Präparate der Cohn-Fraktion-II zur Bildung von Präzipitaten. Durch Erhitzen der Cohn-Fraktion-II auf 63°C für 10 Minuten nimmt die Reaktionsfähigkeit mit dem Rheumafaktor erheblich zu.

E d e l m a n n , K u n k e l und F r a n k l i n (41) haben zwecks weiterer Klärung der Rheumafaktornatur das Verhalten

des isolierten 19-S-RF zu löslichen Antigen-Antikörper-Komplexen untersucht. Es zeigte sich, daß der Rheumafaktor in der Lage war, solche Komplexe bei Antigenüberschuß zu präzipitieren. Voraussetzung war, daß die Sedimentationsrate dieser Komplexe größer als 22-S war. Erhitzen des isolierten RF auf 56°C machte die Aktivität nicht reversibel. Auch V a u g h a n (42) studierte das Verhalten des RF zu Immunsystemen und kam zu unterschiedlichen Ergebnissen. Während Antigen-Kaninchen-Antikörper-Präzipitate eine starke Absorptionskraft auf den Rheumafaktor ausübten, hatten andere Immunpräzipitate mit Antikörpern vom Pferd oder Meerschweinchen diese Fähigkeit nicht. Dabei ist wichtig, daß ein solches Antigen-Meerschweinchen-Antikörper-System nach Komplementinaktivierung in der Lage war, den RF zu absorbieren. Was die Reaktionsweise des RF mit bestimmten Antigen-Antikörper-Systemen betrifft, so besteht eine gewisse Ähnlichkeit mit dem Verhalten des Komplements im Normalserum. S i n g e r (43) hat gezeigt, daß der RF nicht mit einer der bekannten Komplementkomponenten gleichgesetzt werden kann. Es ist bekannt (44), daß Erhitzen auf 56°C die Fähigkeit des Komplements zerstört, sich an Antigen-Antikörper-Komplexe zu binden. Wie schon erwähnt, wird die Bindung des RF an Immunpräzipitate durch vorheriges Erhitzen nicht verhindert. Nach Untersuchungen von R o b e c c h i und D a n e o (45) besteht in Rheumatikerseren auch keine Beziehung zwischen der Höhe des Komplementtiters und der Agglutinationsaktivität.

Es bleibt noch die Frage zu erörtern, ob es sich beim Rheumafaktor um einen Antikörper handelt. Die 19-S-Gammaglobulinfraktion ist von besonderem Interesse, da sie bekannte Antikörper wie die 19-S-Isoagglutinine, die Wassermann-Antikörper, komplette Rh-Agglutinine und gewisse pathologische Haemagglutinine enthält. Es wäre also durchaus möglich, daß der Rheumafaktor ein spezifischer Antikörper ist, da er bezüglich seiner physikalischen und Antigen-Eigenschaften bekannten Antikörpern der 19-S-Fraktion ähnelt (32). Die Fähigkeit des 19-S-Rheumafaktors, mit menschlichem 7-S-Globulin eine Bindung einzugehen, legt es nahe, in diesem 7-S-Gammaglobulin das entsprechende Antigen zu sehen. Auf dieser Bindung be-

ruhen in vitro alle bekannten Agglutinationsreaktionen und Präzipitationsmethoden. Die Auffindung der 28-S-Komponente und die mit diesem Makroglobulin durchgeführten Dissoziierungsversuche machen es möglich, daß eine solche Antigen-Antikörperreaktion auch in vivo stattfinden kann. Unklar ist die Frage, was den Organismus veranlasst, seinem normalen 7-S-Gammaglobulin Antigencharakter zu verleihen bzw. sein normales 19-S-Gammaglobulin so umzuwandeln, daß es ein Bindungsvermögen für das körpereigene 7-S-Gammaglobulin erlangt. Das 19-S-Globulin könnte auf diese Weise zu einem Antikörper gegen körpereigenes Gammaglobulin umgewandelt werden, also praktisch zu einem Antikörper mit Autoantikörpernatur (46). Serologische Untersuchungen von K u n k e l und F u d e n - b e r g (47) zur Frage der Spezifität des RF gegenüber patienteneigenen Gammaglobulin (Autospezifität) und vergleichende Prüfungen mit genetisch differenten Gammaglobulintypen von anderen Individuen (Isospezifität) haben ergeben, daß wahrscheinlich sowohl Auto- als auch Isospezifität vorkommen können. Damit scheint es möglich, die Autoantikörperfunktion des RF zu diskutieren.

Einige Autoren haben in den letzten Jahren versucht, auf tierexperimentellem Wege ein Makroglobulin zu erzeugen, das ähnliche Eigenschaften aufweist wie das den Rheumafaktor enthaltende Makroglobulin. S v a r t z und S c h l o s s m a n n (10) berichten über solche Versuche, bei denen mit Hilfe von Streptokokken der Gruppe B und anderen Bakterien bei Ratten eine haemagglutinierende Substanz erzeugt wurde, deren Seren nach Absorption der heterophilen Haemagglutinine Titer bis 1:256 aufwiesen. Nach Zentrifugation ergaben sich Eigenschaften, die auf einer weitgehenden Ähnlichkeit mit dem 19-S-RF schließen lassen. Nach L e r n e r und Mitarb. (48) läßt sich dieser im Tierexperiment erzeugte Haemagglutinationsfaktor aber nicht sicher mit dem Rheumafaktor des Menschen gleichsetzen. Nach M ü l l e r - E b e r h a r d (31) handelt es sich bei dieser haemagglutinierenden Substanz um einen Antikörper gegen im Blut der Tiere zirkulierende Antigen-Antikörper-Komplexe, die aus dem bakteriellen Antigen und dem ent-

sprechenden Antikörper bestehen.

Nach dem augenblicklichen Stand der Untersuchungen besteht kein Zweifel daran, daß der sogenannte Rheumafaktor ein für die chronische Polyarthrititis charakteristisches Gammaglobulin darstellt, wenn auch sogenannte "falschpositive" Agglutinationsreaktionen bei nicht rheumatischen Erkrankungen wie z.B. bei Lebererkrankungen, Virusinfektionen, Lues und Kollagenkrankheiten bekannt sind. Es bestünde ja auch die Möglichkeit, daß andere dem Rheumafaktor ähnliche Makroglobuline die Ursache dieser sogenannten falschpositiven Agglutinationsreaktionen bei nicht rheumatischen Erkrankungen sind. Irgendeine Bedeutung für die Ätiologie und die Pathogenese der primär-chronischen Polyarthrititis hat der Rheumafaktor bisher nicht erlangt. Die zum Nachweis des Rheumafaktors entwickelten serologischen Methoden haben aber eine nicht unerhebliche klinische Bedeutung.

Nach einer Beobachtung von H e l l e r und Mitarb. (12) können bestimmte Vollseren von Normalpersonen die Haemagglutination von sensibilisierten Hammelerythrocyten durch Rheumatikerserum hemmen. Es zeigte sich, daß diese inhibitorische Aktivität in der menschlichen Cohn-Fraktion-II enthalten war. Z i f f (11) beobachtete einen in der Euglobulinfraktion fast aller Normalpersonen enthaltenen Inhibitor, der den Schafzelltest hemmt und in fast 100% der Patienten mit primär chronischer Polyarthrititis zu fehlen scheint. V a u g h a n und W a l l e r (49) fanden, daß menschliches Gammaglobulin von niedrigem Molekulargewicht die Agglutination von mit menschlichen Rh-Antikörpern beladenen Erythrocyten hemmt. Studien von E d e l m a n n , K u n k e l und F r a n k l i n (41) zeigten, daß frisches als auch chemisch bzw. physikalisch alteriertes 7-S-Kaninchen-Gammaglobulin die Reaktion des Schafzelltests inhibiert. Durch Hitzeeinwirkung von 63°C entstandene Gammaglobulin-Aggregate waren ebenfalls befähigt, die Agglu-

tion sensibilisierter Hammelblutkörperchen zu hemmen. C h r i s t i a n (50) konnte diese Beobachtung für den F-II-Test bestätigen, bei dem Taninsäure-behandelte Schafer erythrocyten verwendet werden, die mit menschlicher Cohn-Fraktion-II sensibilisiert werden. Die Hemmwirkung von aggregiertem Gamma-globulin wurde von D e i c h e r (51) auch für den Latex-Fixationstest nachgewiesen. B r i n e , W e d g w o o d und C l a r k (52) sowie S c h u b a r t und C a l k i n s (53) beobachteten bei Ausführung des Latex-Fixationstests öfter in niedrigen Serumverdünnungen eine auffallende Agglutinationshemmung der Latex-Partikel, das sogenannte Prozonophänomen. Diese Erscheinung schrieben sie der Wirkung eines thermolabilen Inhibitors zu. S c h u b a r t (54, 55) führte den Latex-Fixationstest sowohl mit frischem als auch mit inaktiviertem Rheumatikerserum durch. In 25 von 177 Fällen mit primär chronischer Polyarthrititis war bei Verwendung des Nativserums eine vollkommene Hemmung im Latex-Fixationstest sichtbar, die nach Hitzeinaktivierung der Seren verschwand und durch hohe Agglutinationstiter abgelöst wurde. Weitere Untersuchungen zur Charakterisierung des thermolabilen Inhibitors stammen ebenfalls von S c h u b a r t und Mitarb. (55). Kurzfristiges Erhitzen bei 56°C hatte schon eine erhebliche Abschwächung des Prozonophänomens zur Folge. Nach Inaktivierung der Seren bei 56°C für 11 bis 15 Minuten kam es zum vollständigen Verlust der inhibitorischen Aktivität. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen sowie Aufbewahrung der Seren im Kühlschrank für 6 bis 22 Tage bei 1 bis 4°C führte zur weitgehenden Zerstörung des Inhibitors. Nach Einfrieren der Seren bei minus 20°C erwies sich der Inhibitor als relativ stabil. S c h u b a r t (55) prüfte auch den Einfluß von Normalseren auf den Latex-Fixationstest. Der Inhibitionsgrad von 15 frischen Normalseren wurde nach Hitzeinaktivierung in acht Fällen merklich reduziert und war nur in sieben Fällen nicht mehr nachweisbar. Damit schien es wahrscheinlich, daß der thermolabile Inhibitor auch ein natürlicher Bestandteil des Normalserums ist. Daß auch nach Inaktivierung noch inhibitorische Aktivität feststellbar war, ließ die Existenz eines zweiten relativ hitzestabilen Inhibitors

vermuten, der in diesen Seren wirksam wurde. Komplement-Absorptionsversuche von S c h u b a r t (55) legen die Vermutung nahe, daß der thermolabile Inhibitor mit der ersten Komplement-Komponente identisch oder zumindest mit ihr assoziiert ist. Auch R a n t z , R a n d a l l und K e t t n e r (56) beschrieben zwei Inhibitoren für den Latex-Fixationstest im Serum von Normalpersonen, von denen der eine elektrophoretisch in der Gammaglobulinfraktion und der andere im Alpha-Beta-Globulinbereich lokalisiert wurden. Von diesen beiden Inhibitoren war der im Alpha-Beta-Bereich liegende wesentlich wirksamer als der Gamma-Inhibitor. Nach Ansicht der Autoren waren "Reaktant" und Gammaglobulin-Inhibitor identisch. Nach Untersuchungen von D e i c h e r (51) lassen sich γ_1 -Inhibitor und Reaktant elektrophoretisch klar voneinander trennen. Auch F r a n k l i n (57) beschrieb für den Schafzelltest zwei Inhibitoren, die im Gamma- bzw. α_2 -Globulin-Bereich lagen. Ausführliche zonenelektrophoretische Untersuchungen von D e i c h e r (58) ergaben, daß sich in Normalseren Proteine mit inhibitorischer Aktivität sowohl im γ_1 - β_2 -Bereich als auch im α_2 -Bereich fanden. Diese Ergebnisse bestätigen die von R a n t z und F r a n k l i n (56, 57) erhobenen Befunde. Ein Maß für die Inhibitionsstärke der einzelnen Inhibitoren wurde nach D e i c h e r (58) in der Anzahl der Agglutinationseinheiten ausgedrückt, die diese zu hemmen im Stande waren. Es stellte sich heraus, daß der Gehalt an α_2 -Inhibitor in allen untersuchten Seren der gleiche war, während der Gehalt an γ_1 -Inhibitor in den einzelnen Seren sehr unterschiedlich war. Nach Euglobulinfraktionierung fand sich der γ_1 -Inhibitor zum größten Teil im Euglobulin, während der α_2 -Inhibitor größtenteils in der überstehenden Flüssigkeit zurückblieb. Durch Erhitzen des frischen Serums auf 56°C für 30 Minuten kam es zu einem erheblichen Anstieg der inhibitorischen Aktivität im Gammaglobulin-Bereich. Auch die γ_2 -Globuline zeigten jetzt hemmende Eigenschaften. Im Gegensatz dazu fand sich im α_2 -Bereich eine deutliche Verminderung der Hemmwirkung, die nach Erhitzen der isolierten α_2 -Fraktion auf 56°C vollkommen aufgehoben war. Der α_2 -Inhibitor erwies sich somit als thermolabil und ist vermut-

lich mit dem von S c h u b a r t (54, 55) beschriebenen identisch, während der δ_1 -Inhibitor mehr hitzestabile Eigenschaften aufwies. Der γ_1 -Inhibitor hat nach D e i c h e r (58) ähnliche Eigenschaften wie aggregierte Cohn-Fraktion-II, da sowohl Cohn-Fraktion-II als auch die isolierte γ_1 -Fraktion durch Erhitzen starke inhibitorische Aktivität entwickelten. Immunelektrophoretische Untersuchungen der durch Zonenelektrophorese gewonnenen Proteinfractionen ergaben, daß der γ_1 -Inhibitor die Spezifität des Gammaglobulins zeigt, nicht die von β_2 M- oder β_2 A-Globulin. Diese Befunde berechtigen nach D e i c h e r (58) zu dem Schluß, daß es sich beim γ_1 -Inhibitor um aggregiertes leichtes Gammaglobulin handelt. Der δ_2 -Inhibitor konnte immunoelektrophoretisch nicht endgültig charakterisiert werden, Haptoglobin, δ_2 -Makro-Globulin, δ_1 - und δ_2 -Lipoprotein konnten aber als Inhibitoren ausgeschlossen werden.

Nach D e i c h e r (58) kommt die Hemmwirkung im Latex-Fixationstest durch bevorzugte Besetzung des Rheumafaktors mit den Inhibitoren zustande, sodaß dieser nicht mehr mit dem Reaktanten, d.h. Cohn-Fraktion-II, reagieren kann, wobei der hitzelabile δ_2 -Inhibitor die größere Rolle spielt.

E i g e n e U n t e r s u c h u n g e n

Es war Aufgabe der Untersuchungsreihen, durch besondere Versuchsanordnungen Aufschluß über die Reaktionsweise der Faktoren zu erhalten, die die latexagglutinierende Wirkung des Rheumafaktors inhibieren. Als Ausgangspunkt diente die bisherige Erkenntnis der Existenz eines hitzelabilen und eines hitzestabilen Inhibitors.

Untersuchungsmaterial, Reagenzien und apparative Ausrüstung

- a) Hochtitriges rheumafaktor-positives Rheumatikerserum.
- b) Rheumafaktor-negatives Serum einer gesunden Versuchsperson (Normalserum).
- c) Suspension mit Gammaglobulin (Cohn-Fraktion-II) beladener Latex-Partikel (handelsübliches Reagenz der Behringwerke, Marburg).
- d) Glykokoll-NaCl-Pufferlösung pH 8,2 (handelsübliches Reagenz der Behringwerke, Marburg).
- e) Eppendorf-Photometer (Filter mit einer Wellenlänge von 578 nm, Schichtdicke 10 mm).

Methodik

Für die Untersuchungen wurde eine nach B e r n h a r d (59) modifizierte Methode des Latex-Fixationstests gewählt, die eine genaue Erfassung des Agglutinationsgrades der Latex-Partikel nach Bindung von Reaktor (Rheumafaktor) an Reaktant (Latex-Partikel) zuläßt. Das Prinzip dieser Modifikation besteht in der Messung der optischen Dichte des Überstandes nach Zentrifugation der agglutinierten Latex-Partikel. Mit dieser Methode war es möglich, den inhibierenden Einfluß von menschlichem Normalserum auf dieses System unter verschiedensten Versuchsbedingungen zu studieren.

Im folgenden wird der Untersuchungsgang näher erläutert: Mit Glykokoll-NaCl-Puffer (d) wird eine geometrische Verdünnungsreihe des Rheumatikerserums (a) von 1:20 bis 1:10240 hergestellt, wobei jedes Röhrchen 2 ml der entsprechenden Verdünnung

enthält. Jeder Versuch schließt außerdem ein Kontrollröhrchen ein, in dem anstelle des Rheumatikerserums reine Pufferlösung (d) enthalten ist. Sämtliche Röhrchen werden dann mit je 2 ml einer mit Puffer (d) auf 1:50 verdünnten Latexsuspension beschickt. Die Mischung der beiden Reaktionsteilnehmer wird dann bei je nach Fragestellung der Versuche unterschiedlichen Temperaturen und Zeiten inkubiert, im allgemeinen 60 Minuten bei 56°C. Nach Messung der optischen Dichte (OD) des Kontrollröhrchens, das als Maß für die vollständige Konzentration der suspendierten Latex-Partikel gilt, werden sämtliche Röhrchen 5 Minuten bei 2400 U/min zentrifugiert, dann vorsichtig aufgeschüttelt, um das Sediment zu resuspendieren, und nochmals 10 Minuten bei 1200 U/min zentrifugiert. Die Überstände der Röhrchen werden vorsichtig, ohne den Bodensatz aufzuwirbeln, in Küvetten abgegossen und deren OD-Messungen im Eppendorf-Photometer mit Filter 578 nm (e) ermittelt. Die optische Dichte der Überstände stellt ein Maß für die nicht agglutinierten noch in Suspension befindlichen Latex-Partikel dar, während sich die agglutinierten Partikel im Zentrifugationsrückstand befinden und sich so der OD-Messung entziehen. Die optische Dichte des zentrifugierten Kontrollröhrchens liegt bei etwa 88 bis 75 % der optischen Dichte bei vollsuspendierten Latex-Partikeln, was einer Spontanagglutination von 12 bis 25 % der Latex-Partikel entspricht. Nach den Vorversuchen wurde zunächst die optische Dichte des Kontrollröhrchens nach Zentrifugation, also nach Abzug der spontanagglutinierten Latex-Partikel, als 100%-Wert der optischen Dichte angesehen. Im Laufe der Untersuchungen stellte es sich als zweckmäßig heraus, eventuelle Serumtrübungen bei der OD-Messung möglichst auszuschalten, um mit Ergebnissen anderer Untersuchungsreihen exakt vergleichbare Werte zu erzielen. Bei Berechnung der prozentualen optischen Dichte wurde der 100%-Wert nicht mit Latex-Puffer-Suspension, sondern mit den jeweiligen Seren festgelegt. Es wurde dabei eine Serumverdünnung verwandt, die keine Agglutination der Latex-Partikel mehr verursacht, also eine Verdünnung, dessen Überstand bei der OD-Messung gegenüber niedrigeren Verdünnungen keine Änderung der photometrischen

Trübungsmessung mehr ergibt. Dies war in der Regel das Röhrchen mit einer Verdünnung von 1:10240. Auf diesen Festpunkt wurden die OD-Messungen der Überstände bei den verschiedenen Rheumaserumverdünnungen bezogen und als Prozent der optischen Dichte berechnet. Zur graphischen Darstellung wurden die Prozente der Messungen auf der Ordinate und die Verdünnungen des Rheumatikerserums auf der Abszisse eines Koordinatensystems eingetragen. Die Eintragung der OD-Werte eines Versuchs ergibt jeweils eine Kurve, die den Ablauf der Agglutinationsreaktion wiedergibt.

In weiteren Untersuchungen wurde die Beeinflussung der Latexagglutination des Rheumatikerserums (Referenzserum) durch Normalserum studiert, wobei, wie schon erwähnt, von der Existenz eines hitzelabilen und eines hitzestabilen Inhibitors ausgegangen wurde. Durch Zugabe von mit Pufferlösung hergestellten Normalserumverdünnungen vermehrte sich die Zahl der Reaktionsteilnehmer um einen weiteren. 2 ml einer solchen Verdünnung (1:5 bzw. 1:10), die in einem Versuch immer die gleiche war, wurden jedem Röhrchen der Rheumaserumverdünnungen hinzugefügt. Je nach Fragestellung variierte dabei die Reihenfolge der Zugabe der einzelnen Reaktionsteilnehmer sowie die Inkubationsdauer und -temperatur. Das Normalserum wurde teils in nativem, teils in inaktiviertem Zustand verwandt. Die einzelnen Versuchsanordnungen sind neben einer textlichen Erläuterung (s.u.) der Übersichtlichkeit halber in Formeln dargestellt. Hierbei bedeuten: R = Rheumatikerserum, N = Normalserum, L = Suspension mit Gammaglobulin (Cohn-Fraktion-II) beladener Latexpartikel. In den Versuchen, in denen zwei Inkubations- bzw. Inaktivierungstemperaturen und -zeiten angegeben sind, wurde der untere Vorgang im Anschluß an den oberen durchgeführt.

Zur Beantwortung der unten aufgeführten Fragestellungen waren bestimmte Versuchsanordnungen mit unterschiedlicher Kombination der Reaktionsteilnehmer und verschiedene Maßnahmen wie Inaktivierung des Normalserums (30 Minuten, 56°C) und verschiedene Inkubations- bzw. Inaktivierungstemperaturen und -zeiten erforderlich.

Versuchsanordnungen

- 1) (R + L) 30' 37°
- 2) (R + L) 45' 37°
- 3) (R + L) 60' 37°
- 4) (R + L) 30' 56°
- 5) (R + L) 60' 56°
- 6) (N + L) 45' 37°
- 7) [(N 1:5
nativ + L) 45' 37° + R] 90' 56°
- 8) [(N 1:5
inakt. + L) 45' 37° + R] 90' 56°
- 9) [(N 1:10
nativ + L) 45' 37° + R] 90' 56°
- 10) [(N 1:10
inakt. + L) 45' 37° + R] 90' 56°
- 11) [(N 1:5
nativ + L) 45' 37° + R] 45' 37°
- 12) [(N 1:5
nativ + R) 45' 37° + L] 45' 37°
- 13) [(R + L) 45' 37° + N 1:5
nativ] 45' 37°
- 14) [(N 1:10
nativ + L) 45' 37° + R] 45' 37°
- 15) [(N 1:10
nativ + R) 45' 37° + L] 45' 37°
- 16) [(R + L) 45' 37° + N 1:10
nativ] 45' 37°
- 17) [(N 1:10
nativ + L) 45' 37° + R] 60' 56°

- 18) $\left[\left(N \begin{smallmatrix} 1:10 \\ \text{inakt.} \end{smallmatrix} + L \right) 45' 37^{\circ} + R \right] 60' 56^{\circ}$
- 19) $\left[\left(N \begin{smallmatrix} 1:10 \\ \text{nativ} \end{smallmatrix} + L \right) 30' 56^{\circ} + R \right] 60' 56^{\circ}$
- 20) $\left[\left(N \begin{smallmatrix} 1:10 \\ \text{nativ} \end{smallmatrix} + R \right) 45' 37^{\circ} + L \right] 60' 56^{\circ}$
- 21) $\left[\left(N \begin{smallmatrix} 1:10 \\ \text{nativ} \end{smallmatrix} + R \right) \begin{smallmatrix} 45' 37^{\circ} \\ 30' 56^{\circ} \end{smallmatrix} + L \right] 60' 56^{\circ}$
- 22) $\left[\left(N \begin{smallmatrix} 1:10 \\ \text{inakt.} \end{smallmatrix} + R \right) 45' 37^{\circ} + L \right] 60' 56^{\circ}$
- 23) $\left[\left(N \begin{smallmatrix} 1:10 \\ \text{nativ} \end{smallmatrix} + L \right) \begin{smallmatrix} 45' 37^{\circ} \\ 30' 56^{\circ} \end{smallmatrix} + R \right] 60' 56^{\circ}$
- 24) $\left[\left(R + L \right) 60' 56^{\circ} + N \begin{smallmatrix} 1:10 \\ \text{nativ} \end{smallmatrix} \right] 45' 37^{\circ}$

Tab. A

Versuch	1		2		3		4	
R.-Verd.	Meßwert	OD(%)	Meßwert	OD(%)	Meßwert	OD(%)	Meßwert	OD(%)
1:20	8,8	39,1	5,8	22,6	4,8	23,3	8,8	40,4
1:40	7,7	34,2	5,5	21,4	4,1	19,9	7,7	35,3
1:80	7,3	32,4	4,9	19,1	4,1	19,9	7,3	33,5
1:160	8,0	35,6	5,5	21,4	5,5	26,7	7,3	33,5
1:320	10,3	45,7	7,0	27,2	6,0	29,1	9,4	43,1
1:640	12,1	53,7	12,5	48,6	9,7	47,1	13,4	61,4
1:1280	17,0	75,5	21,0	81,7	15,6	75,7	18,7	85,7
1:2560	20,0	88,8	24,8	96,4	20,1	97,5	22,8	100,0
1:5120	21,8	96,8	25,6	99,6	20,6	100,0	22,8	100,0
1:10240 (Kontr.)	22,5	100,0	25,7	100,0	20,6	100,0	22,8	100,0

Versuch	5		6		7		8	
R.-Verd.	Meßwert	OD(%)	Meßwert	OD(%)	Meßwert	OD(%)	Meßwert	OD(%)
1:20	5,5	23,3	26,5	98,0	16,9	55,9	8,0	28,1
1:40	4,5	19,1	26,6	99,0	17,8	58,9	8,9	31,2
1:80	3,9	16,5	26,6	99,0	18,8	62,2	12,0	42,1
1:160	4,1	17,4	27,8	103,0	21,6	71,5	18,8	65,9
1:320	6,2	26,3	26,5	98,0	24,2	80,1	24,7	86,6
1:640	9,8	41,5	26,5	98,0	26,2	86,7	26,4	92,6
1:1280	17,0	72,0	28,0	105,0	28,6	95,3	27,8	97,5
1:2560	20,6	87,2	26,5	98,0	27,5	91,0	27,8	97,5
1:5120	22,8	96,6	27,5	102,0	30,2	100,0	28,5	100,0
1:10240 (Kontr.)	23,6	100,0	26,5	98,0	30,2	100,0	28,5	100,0

Tab. B

Versuch	9		10		11		12	
R.-Verd.	Meßwert	OD(%)	Meßwert	OD(%)	Meßwert	OD(%)	Meßwert	OD(%)
1:20	7,7	29,2	4,6	15,6	17,8	59,3	14,0	44,3
1:40	7,7	29,2	4,6	15,6	18,5	61,6	15,0	47,4
1:80	10,2	38,6	4,9	16,6	17,8	59,3	16,8	53,1
1:160	-	-	7,7	26,1	20,5	68,3	19,1	60,4
1:320	20,7	78,4	15,5	52,5	24,2	80,6	24,0	75,9
1:640	22,5	85,2	23,0	77,9	27,4	91,3	26,6	84,1
1:1280	23,0	87,1	25,7	87,1	27,4	91,3	30,8	97,4
1:2560	24,6	93,1	27,5	93,2	29,3	97,6	30,6	96,8
1:5120	26,3	99,6	28,8	97,6	29,5	98,3	30,8	97,4
1:10240 (Kontr.)	26,4	100,0	29,5	100,0	30,0	100,0	31,6	100,0

Versuch	13		14		15		16	
R.-Verd.	Meßwert	OD(%)	Meßwert	OD(%)	Meßwert	OD(%)	Meßwert	OD(%)
1:20	7,4	26,5	15,5	50,8	13,7	45,2	5,5	19,7
1:40	6,4	22,9	14,0	45,9	13,5	44,5	5,6	20,0
1:80	7,7	27,6	13,5	44,2	13,5	44,5	5,6	20,0
1:160	8,9	31,9	15,0	49,1	13,7	45,2	7,5	26,9
1:320	11,6	41,5	18,1	59,3	17,6	58,0	10,8	38,7
1:640	18,6	66,6	23,0	75,4	20,6	67,9	16,9	60,5
1:1280	24,8	88,8	26,0	85,2	24,2	79,8	23,4	83,8
1:2560	27,8	99,6	28,0	91,8	26,5	87,4	25,7	92,1
1:5120	27,8	99,6	28,4	93,1	28,6	94,3	27,5	98,5
1:10240 (Kontr.)	27,9	100,0	30,5	100,0	30,3	100,0	27,9	100,0

Tab. C

Versuch	17		18		19		20	
R.-Verd.	Meßwert	OD(%)	Meßwert	OD(%)	Meßwert	OD(%)	Meßwert	OD(%)
1:20	8,8	35,9	7,8	32,1	8,8	36,2	7,3	30,7
1:40	7,5	30,6	7,3	30,0	8,8	36,2	9,4	39,5
1:80	8,4	34,3	6,5	26,7	11,7	48,1	11,0	46,2
1:160	11,2	45,7	8,0	32,9	16,6	68,3	14,3	60,0
1:320	18,1	73,8	12,1	49,7	21,0	86,4	18,1	76,0
1:640	21,8	88,9	18,7	76,9	22,5	92,5	22,5	94,5
1:1280	23,4	95,5	22,5	92,5	22,8	93,8	23,1	97,0
1:2560	24,0	97,9	22,7	93,4	23,5	96,7	23,6	99,1
1:5120	24,5	100,0	24,0	98,7	23,7	97,5	23,8	100,0
1:10240 (Kontr.)	24,5	100,0	24,3	100,0	24,3	100,0	23,8	100,0

Versuch	21		22		23		24	
R.-Verd.	Meßwert	OD(%)	Meßwert	OD(%)	Meßwert	OD(%)	Meßwert	OD(%)
1:20	10,5	45,0	5,9	26,2	8,9	37,1	5,0	21,7
1:40	10,3	44,2	5,9	26,2	8,9	37,1	3,8	16,5
1:80	12,3	52,7	5,9	26,2	13,0	54,1	3,8	16,5
1:160	15,0	64,3	6,7	29,8	18,0	75,0	5,8	25,2
1:320	19,0	81,5	9,0	40,0	21,5	89,5	11,0	47,8
1:640	20,6	88,4	15,4	68,4	21,5	89,5	18,1	78,6
1:1280	21,4	91,8	20,6	91,5	22,5	93,7	21,8	94,7
1:2560	21,7	93,1	21,7	96,4	22,8	95,0	23,0	100,0
1:5120	21,7	93,1	22,0	97,7	22,8	95,0	23,0	100,0
1:10240 (Kontr.)	23,3	100,0	22,5	100,0	24,0	100,0	23,0	100,0

Fragestellung 1

Um die Brauchbarkeit der obigen Methode als Latex-Fixations-test zu zeigen, wurde zunächst die optische Dichte des Überstandes bei verschiedenen Rheumatiker Serumverdünnungen im Vergleich zu einem Normalserum bestimmt. In den mit Rheumatiker Serum durchgeführten Versuchen wurden sowohl die Inkubationstemperaturen (37°C und 56°C) als auch die Inkubationszeiten variiert, um festzustellen, unter welchen Versuchsbedingungen eine möglichst vollständige Bindung des Rheumafaktors an die beladenen Latex-Partikel erreicht wird. Zur Anwendung kamen ausschließlich Nativ-Seren. Den einzelnen Rheumatiker- und Normalserumverdünnungen wurde jeweils die gleiche Menge Latexsuspension beigegeben und die Mischungen je nach Versuch bei unterschiedlichen Zeiten und Temperaturen inkubiert. Nach zweimaligem Zentrifugieren wurde die optische Dichte des Überstandes ermittelt und in Prozent des Kontrollwertes ausgedrückt.

Versuchsanordnungen:

Versuch 1) (R + L) 30' 37°
2) (R + L) 45' 37°
3) (R + L) 60' 37°
4) (R + L) 30' 56°
5) (R + L) 60' 56°
6) (N + L) 45' 37°

Besprechung der Ergebnisse

Die in Tab. A und Abb. I dargestellten Versuchsergebnisse be- weisen die Brauchbarkeit der Methode zur Erfassung der abge- laufenen Latex-Agglutination. Außerdem zeigt die Methode eine hohe Empfindlichkeit. Aus den Kurven 1 bis 5 der Abb. I ist ersichtlich, daß die optische Dichte bis zu einer Verdünnung von 1:160 abnorm niedrig liegt, was einem hohen Agglutina- tionsgrad der Latex-Partikel entspricht. Von der Verdünnung 1:320 aufwärts nimmt die optische Dichte deutlich zu und

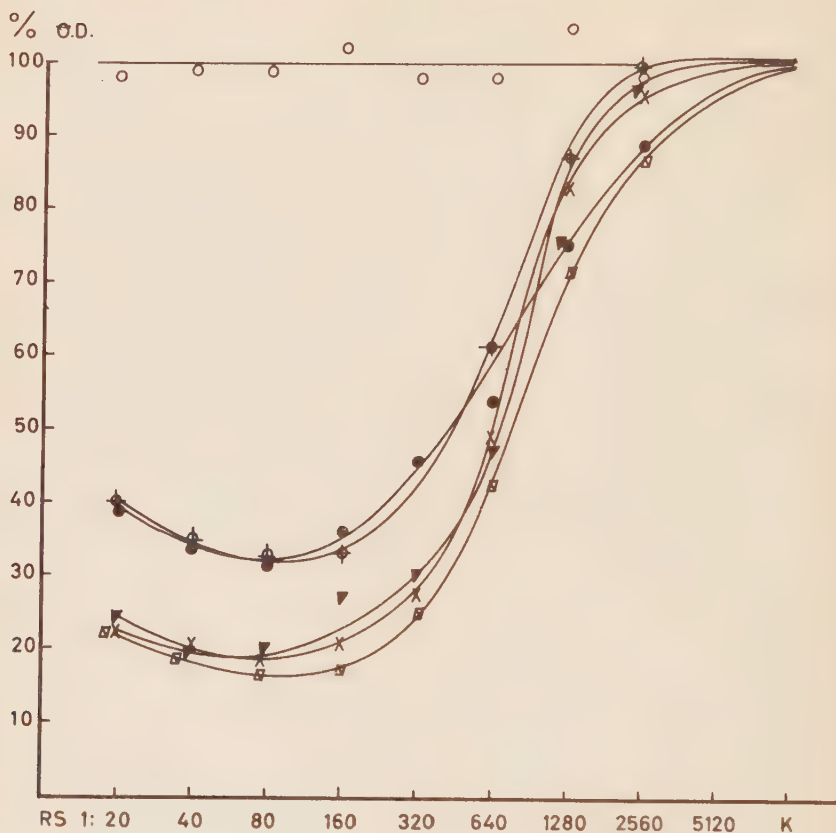


Abb. I: Versuchsanordnungen zu Fragestellung 1

● = (R + L) 30' 37°

◆ = (R + L) 30' 56°

× = (R + L) 45' 37°

◻ = (R + L) 60' 56°

▼ = (R + L) 60' 37°

○ = (N + L) 45' 37°

erreicht etwa bei einer Verdünnung von 1:5120 den Meßwert des Kontrollwertes, d.h. in diesen Verdünnungen findet keine Bindung des Rheumafaktors an die Latex-Partikel mehr statt. Während im Latex-Tropfentest nur bis zu einer Verdünnung von 1:320 eine Agglutination sichtbar war, zeigte die optische Dichte bei dieser Serumverdünnung erst einen allmählichen Anstieg der Meßwerte. Dies macht die Empfindlichkeit der Methodik deutlich.

Wenn man die mit Rheumatikerserum gewonnenen Kurven untereinander vergleicht, so fällt auf, daß bei gleichen Inkubationszeiten die Temperatur 37° oder 56°C ohne Einfluß auf die Vollständigkeit der Bindung zwischen Rheumafaktor und Latex-Partikeln ist, während sich bei Anwendung verschiedener Inkubationszeiten Unterschiede zeigen. Bei einer Inkubationszeit von 30 Minuten findet sich eine stärkere optische Dichte, was einer weniger vollständigen Bindungsreaktion entspricht. Nach einer Inkubationsdauer von 45 Minuten scheint die Reaktion ziemlich vollständig abgelaufen zu sein, da die optische Dichte niedrigere Werte zeigt. Demgegenüber ergibt eine Inkubationszeit von 60 Minuten keine wesentliche Verstärkung des Agglutinationsgrades. Die Ergebnisse zeigen, daß Inkubationszeiten von 45 Minuten für den Ablauf einer vollständigen Bindungsreaktion zwischen Reaktor und Reaktant genügen. Die obige Versuchsanordnung kann wegen ihrer Empfindlichkeit und Reproduzierbarkeit für die folgenden Fragestellungen verwandt werden und gestattet durch Vergleich mit den unten aufgeführten Versuchen, das Ausmaß der inhibitorischen Aktivität von Normalseren zu beurteilen.

Fragestellung 2

Aufgabe dieser Fragestellung war, eine Versuchsanordnung zu finden, die den inhibitorischen Einfluß des nativen Normalserums auf die Reaktor-Reaktant-Bindung deutlich erkennen läßt. Die Mischung von Normalserum und Reaktant wurde zunächst für 45 Minuten bei 37°C inkubiert und anschließend eine geo-

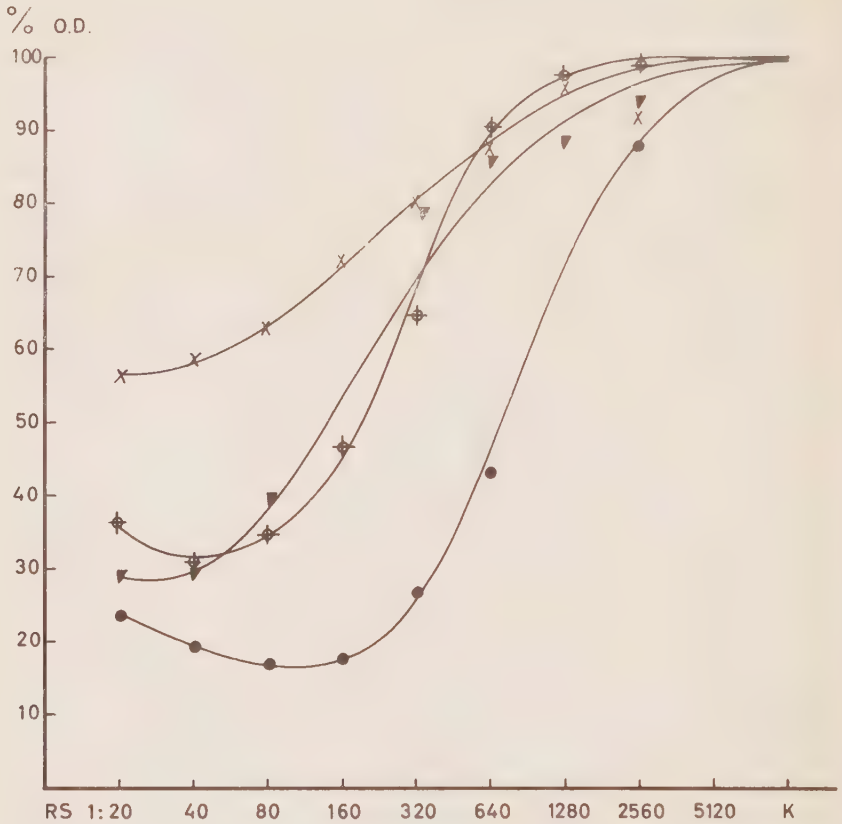


Abb. II: Versuchsanordnungen zu Fragestellung 2

● = (R + L) 60' 56°

x = [(N 1:5 nativ + L) 45' 37° + R] 90' 56°

▼ = [(N 1:10 nativ + L) 45' 37° + R] 90' 56°

⊕ = [(N 1:10 nativ + L) 45' 37° + R] 60' 56°

metrische Verdünnungsreihe des Rheumatikerserums hinzugefügt. Nach Zugabe dieses dritten Reaktionsteilnehmers erfolgte eine weitere Inkubation von 90 Minuten bzw. 60 Minuten bei 56°C . Die Untersuchungen wurden mit Normalserumverdünnungen von 1:5 und 1:10 durchgeführt. Eine Standardkurve, die die alleinige Reaktion zwischen Rheumatikerserum und Reaktant wiedergibt, wird zum Vergleich herangezogen.

Versuchsanordnungen:

Versuch 5) (R + L) $60' 56^{\circ}$ (Standardkurve)

- 7) $\left[\left(\text{N}_{\text{nativ}}^{1:5} + \text{L} \right) 45' 37^{\circ} + \text{R} \right] 90' 56^{\circ}$
9) $\left[\left(\text{N}_{\text{nativ}}^{1:10} + \text{L} \right) 45' 37^{\circ} + \text{R} \right] 90' 56^{\circ}$
17) $\left[\left(\text{N}_{\text{nativ}}^{1:10} + \text{L} \right) 45' 37^{\circ} + \text{R} \right] 60' 56^{\circ}$

Besprechung der Ergebnisse

Die Versuchsergebnisse zeigen eine deutliche Inhibition der Bindungsreaktion zwischen Reaktant und Reaktor durch Normalserum, wenn dieses zuerst der Latexsuspension zugesetzt und das Rheumatikerserum erst als dritte Komponente hinzugefügt wird. Eine Aussage über die eventuelle Reaktion des Inhibitors oder der Inhibitoren mit dem Reaktor oder dem Reaktanten kann noch nicht gemacht werden. Bei Verwendung einer 1:5-Normalserumverdünnung wird die inhibitorische Aktivität gegenüber einer 1:10-Verdünnung erheblich verstärkt. In späteren Versuchen zur eventuellen Aufklärung der Natur und Reaktionsweise der Inhibitoren wird das Normalserum ausschließlich in einer Verdünnung von 1:10 angewandt.

Fragestellung 3

Zur Frage der Thermolabilität bzw. Thermostabilität der Inhibitoren wurden vergleichende Untersuchungen mit nativem bzw. inaktiviertem (30 Minuten, 56°C) Normalserum vorge-

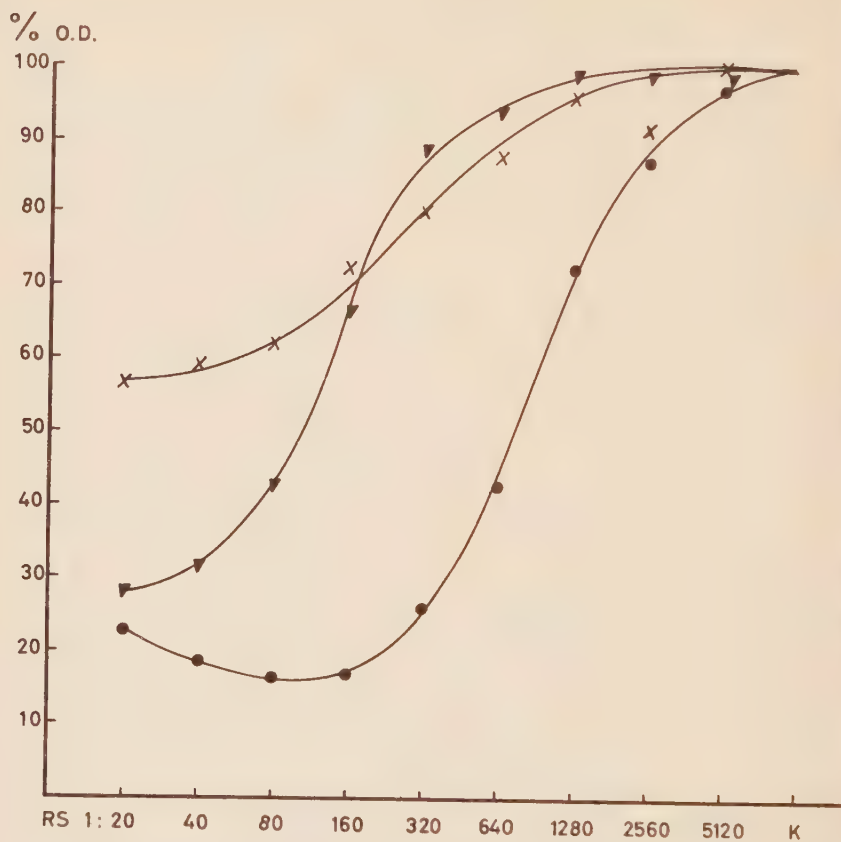


Abb. 111: Versuchsanordnungen zu Fragestellung 3

● = (R + L) 60' 56°

x = [(N^{1:5}_{nativ} + L) 45' 37° + R] 90' 56°

▼ = [(N^{1:5}_{inakt.} + L) 45' 37° + R] 90' 56°

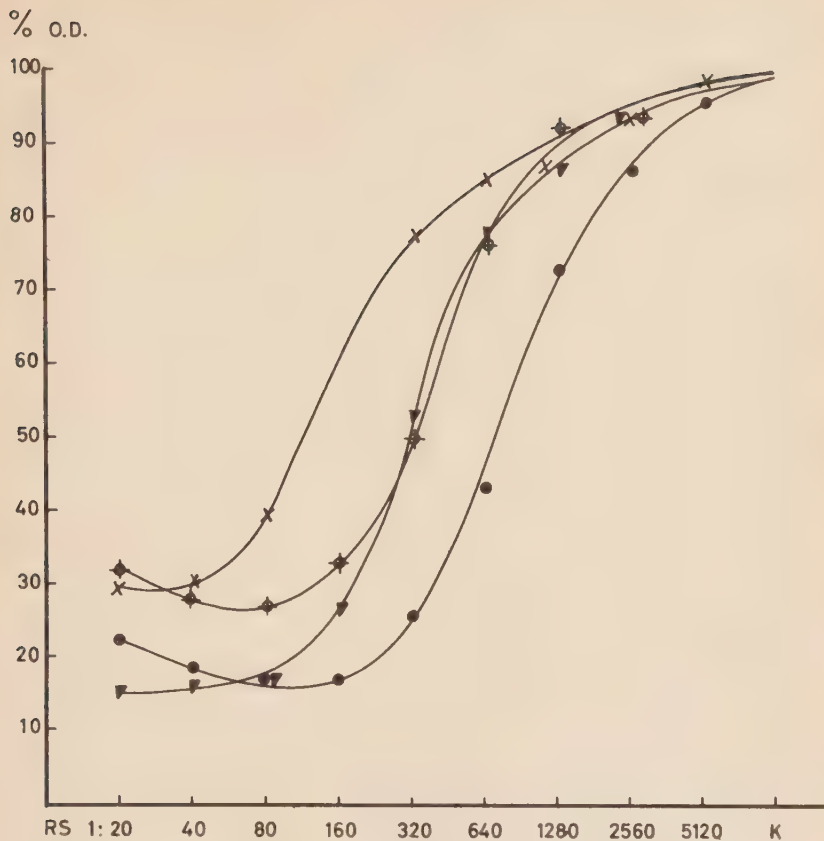


Abb. IV: Versuchsanordnungen zu Fragestellung 3

● = (R + L) 60' 56°

x = [(N 1:10 nativ + L) 45' 37° + R] 90' 56°

▼ = [(N 1:10 inakt. + L) 45' 37° + R] 90' 56°

⊕ = [(N 1:10 inakt. + L) 45' 37° + R] 60' 56°

nommen. Die Versuchsanordnung war die gleiche wie in Fragestellung 2. Normalserumverdünnungen von 1:5 und 1:10 wurden auch hier verwendet.

Versuchsanordnungen:

Versuch 5) (R + L) 60' 56° (Standardkurve)

- 7) $\left[\left(N \begin{smallmatrix} 1:5 \\ \text{nativ} \end{smallmatrix} + L \right) 45' 37^{\circ} + R \right] 90' 56^{\circ}$
- 8) $\left[\left(N \begin{smallmatrix} 1:5 \\ \text{inakt.} \end{smallmatrix} + L \right) 45' 37^{\circ} + R \right] 90' 56^{\circ}$
- 9) $\left[\left(N \begin{smallmatrix} 1:10 \\ \text{nativ} \end{smallmatrix} + L \right) 45' 37^{\circ} + R \right] 90' 56^{\circ}$
- 10) $\left[\left(N \begin{smallmatrix} 1:10 \\ \text{inakt.} \end{smallmatrix} + L \right) 45' 37^{\circ} + R \right] 90' 56^{\circ}$
- 18) $\left[\left(N \begin{smallmatrix} 1:10 \\ \text{inakt.} \end{smallmatrix} + L \right) 45' 37^{\circ} + R \right] 60' 56^{\circ}$

Besprechung der Ergebnisse

Die Ergebnisse der einzelnen Versuche sind in den Abbildungen III und IV und in den Tabellen A, B, und C dargestellt. Es zeigt sich, daß nach Inaktivierung des Normalserums die Inhibitionswirkung deutlich abnimmt, aber nicht aufgehoben wird. Der Grund für diese Tatsache könnte in einer unvollständigen Inaktivierung des hitzelablen Inhibitors oder in der Wirksamkeit eines zusätzlichen hitzestabilen Inhibitors zu suchen sein.

Fragestellung 4

Um die Reaktionsweise der im nativen Normalserum enthaltenen Inhibitoren näher zu untersuchen, werden die unten aufgeführten Versuche diskutiert. Außerdem sollte geklärt werden, welchen Einfluß auf die Ergebnisse eine verschiedene Reihenfolge der Zugabe der Reaktionsteilnehmer ausübt. Die Versuche wurden mit nativem Normalserum in 1:5 und 1:10-Verdünnungen durchgeführt.

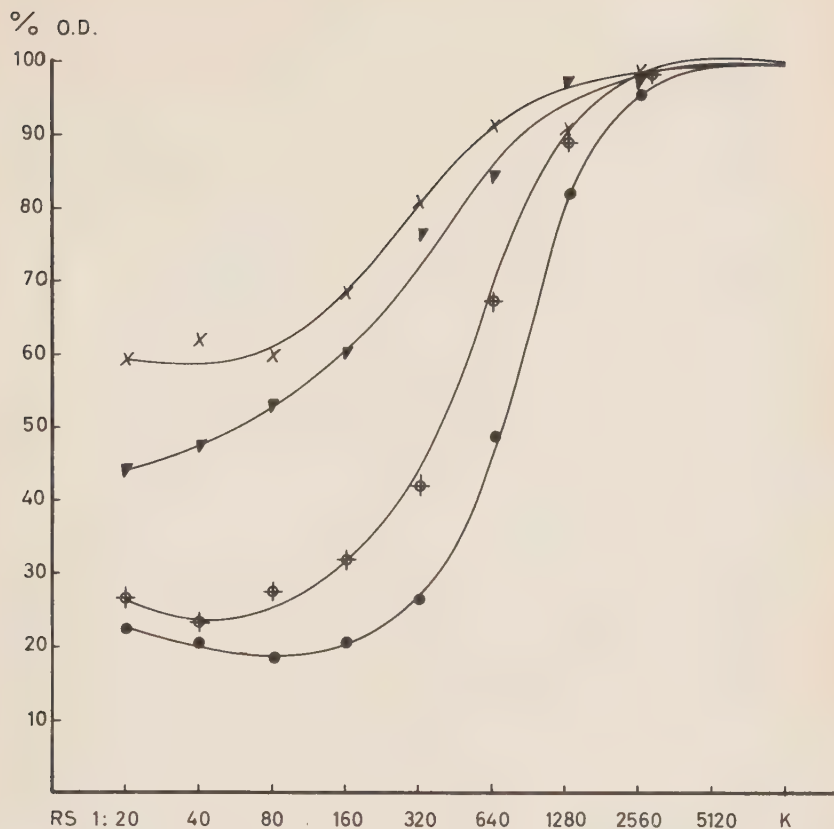


Abb. V: Versuchsanordnungen zu Fragestellung 4

● = (R + L) 45' 37°

X = [(N 1:5 nativ + L) 45' 37° + R] 45' 37°

▼ = [(N 1:5 nativ + R) 45' 37° + L] 45' 37°

◆ = [(R + L) 45' 37° + N 1:5 nativ] 45' 37°

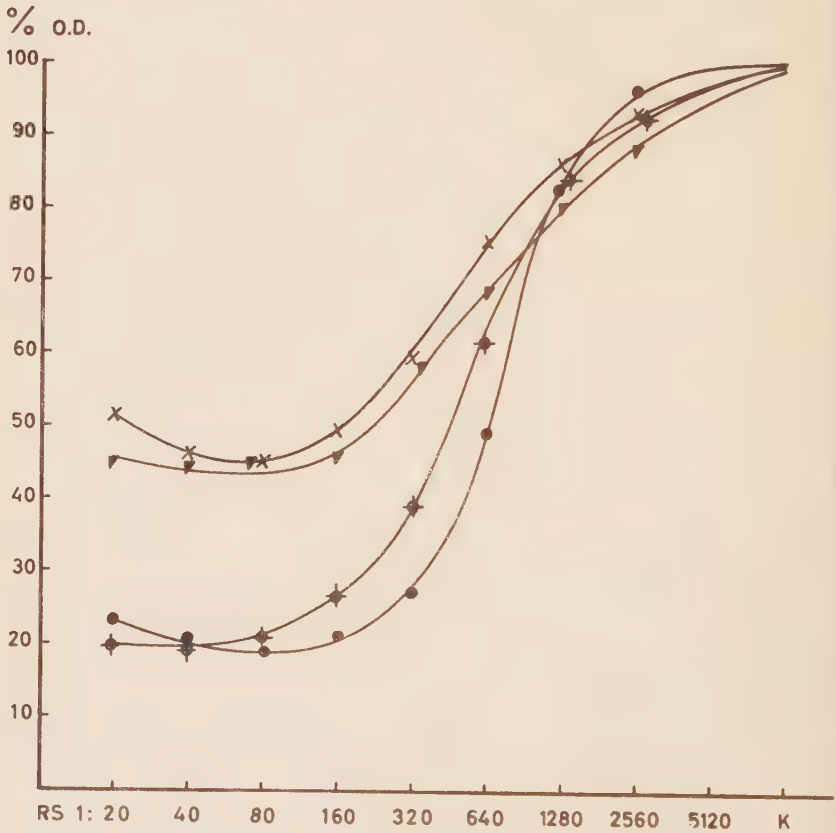


Abb. VI: Versuchsanordnungen zu Fragestellung 4

$$X = [(N \text{ 1:10}_{\text{nativ}} + L) \text{ 45' } 37^{\circ} + R] \text{ 45' } 37^{\circ}$$

$$\nabla = [(N \text{ 1:10}_{\text{nativ}} + R) \text{ 45' } 37^{\circ} + L] \text{ 45' } 37^{\circ}$$

$$\blacklozenge = [(R + L) \text{ 45' } 37^{\circ} + N \text{ 1:10}_{\text{nativ}}] \text{ 45' } 37^{\circ}$$

$$\bullet = (R + L) \text{ 45' } 37^{\circ}$$

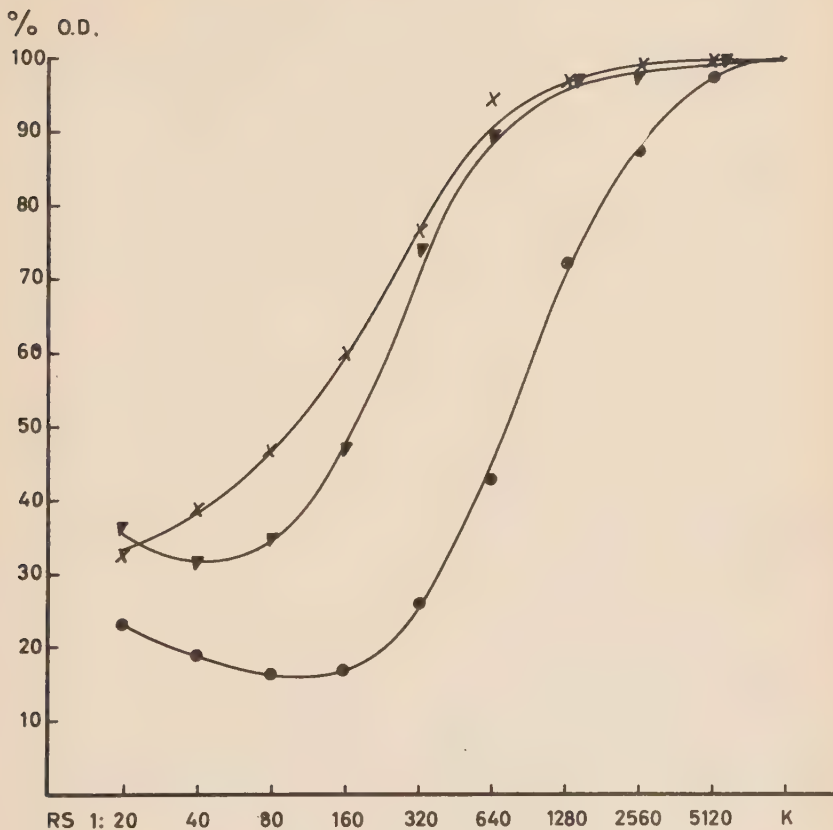


Abb. VII: Versuchsanordnungen zu Fragestellung 4

● = (R + L) 60' 56°

x = [(N 1:10 nativ + R) 45' 37° + L] 60' 56°

▼ = [(N 1:10 nativ + L) 45' 37° + R] 60' 56°

Versuchsanordnungen:

Versuch 2) (R + L) 45' 37°

$$11) [(N \frac{1:5}{\text{nativ}} + R) 45' 37^{\circ} + L] 45' 37^{\circ}$$

$$12) [(N \frac{1:5}{\text{nativ}} + R) 45' 37^{\circ} + L] 45' 37^{\circ}$$

$$13) [(R + L) 45' 37^{\circ} + N \frac{1:5}{\text{nativ}}] 45' 37^{\circ}$$

$$14) [(N \frac{1:10}{\text{nativ}} + L) 45' 37^{\circ} + R] 45' 37^{\circ}$$

$$15) [(N \frac{1:10}{\text{nativ}} + R) 45' 37^{\circ} + L] 45' 37^{\circ}$$

$$16) [(R + L) 45' 37^{\circ} + N \frac{1:10}{\text{nativ}}] 45' 37^{\circ}$$

$$5) (R + L) 60' 56^{\circ}$$

$$20) [(N \frac{1:10}{\text{nativ}} + R) 45' 37^{\circ} + L] 45' 37^{\circ}$$

$$17) [(N \frac{1:10}{\text{nativ}} + L) 45' 37^{\circ} + R] 45' 37^{\circ}$$

Besprechung der Ergebnisse

Die Versuche zeigen, daß gegenüber den Standardkurven der voller Agglutinationsreaktion eine deutliche Inhibition nicht nur feststellbar ist, wenn zunächst Normalserum und Latexsuspension inkubiert werden, wie schon in Fragestellung 2 dargestellt ist, sondern auch dann, wenn zuerst die Mischung von Normalserum und Rheumatikerserum einer Inkubation unterzogen wird. Keine eklatante Hemmung zeigt erwartungsgemäß der Versuch, in dem zunächst Reaktor und Reaktant reagieren. Nach stattgefundenener Reaktion zwischen diesen beiden Reaktionspartnern können die Inhibitoren nicht mehr voll wirksam werden. Das Auftreten einer deutlichen Inhibition bei vorheriger Inkubation von Normalserum und Latexsuspension könnte so ausgelegt werden, daß der hitzelabile Inhibitor auf der Oberfläche der Latex-Partikel Stellen besetzt, die dann für eine nachfolgende Reaktion mit dem RF blockiert sind. Bei gleichzeitiger Zugabe von Normal-

serum und Rheumatikerserum zur Latexsuspension müßte dann allerdings der Inhibitor eine größere Affinität zum Reaktanten besitzen, d.h. schneller reagieren als der Rheumafaktor. Die Tatsache, daß auch eine deutliche Inhibition sichtbar wird, wenn zunächst Normalserum mit Rheumatikerserum zusammengegeben wird, läßt die Frage offen, ob der Inhibitor auch oder ausschließlich mit dem Rheumafaktor reagiert, im letzten Falle auch dann, wenn zuerst Normalserum und Latexsuspension inkubiert werden. Weitere Versuche sollten der Klärung dieser Frage dienen.

Fragestellung 5

Die unter Fragestellung 3 aufgeführten Versuche hatten ergeben, daß die Inhibition wesentlich an Stärke abnimmt, wenn anstelle des nativen inaktiviertes Normalserum mit Latexsuspension inkubiert wird, bevor das Rheumatikerserum als dritter Reaktionsteilnehmer hinzugefügt wird. Die noch in geringem Ausmaß vorhandene Inhibition wird vermutlich durch einen hitzestabilen Inhibitor verursacht. Im vorherigen Abschnitt wurde die Frage erörtert, ob der hitzelabile Inhibitor mit dem Rheumafaktor und nicht mit dem Reaktanten reagiert. Unter dieser Voraussetzung müßte durch Inaktivierung des Gemisches von Normalserum und Latexsuspension für 30 Minuten bei 56°C nach Inkubation für 45 Minuten bei 37°C der thermolabile Inhibitor an Wirksamkeit verlieren. Eine geringer ausgeprägte Inhibition als bei nicht inaktiviertem Gemisch von Normalserum und Latexsuspension müßte dann die Folge sein. Ziel der unten aufgeführten Versuche war es, diese Fragen zu klären. Neben einer Standard-Agglutinationskurve (5) und Standardinhibitionskurve (17) wurde der Versuch (18) gewählt, der die Inaktivierung des Normalserums vor Zugabe der Latexsuspension und schließlichher Zufügung des Rheumatikerserums vorsieht. Diesen Versuchen wurden die Ergebnisse gegenübergestellt, die man erhält, wenn das Normalserum-Latexsuspensions-Gemisch nach erfolgter oder auch ohne Inkubation (45 Minuten, 37°C) inaktiviert und erst zuletzt das Rheu-

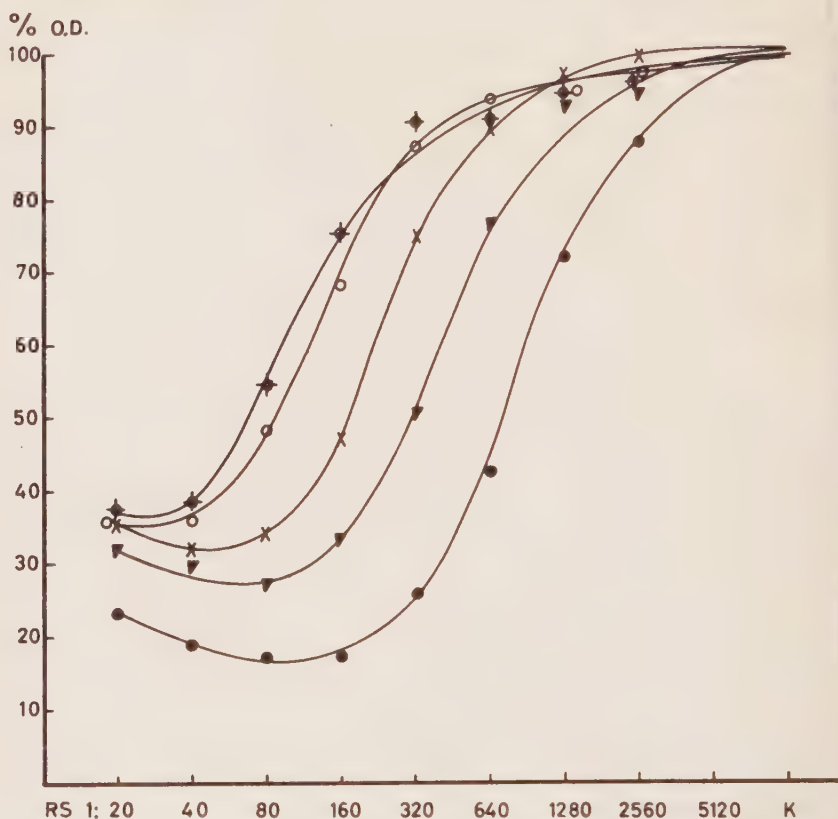


Abb. VIII: Versuchsanordnungen zu Fragestellung 5

● = (R + L) 60' 56°

x = [(N_{nativ} 1:10 + L) 45' 37° + R] 60' 56°

▼ = [(N_{inakt.} 1:10 + L) 45' 37° + R] 60' 56°

◆ = [(N_{nativ} 1:10 + L) 45' 37°/30' 56° + R] 60' 56°

○ = [(N_{nativ} 1:10 + L) 30' 56° + R] 60' 56°

matiker serum zugegeben wird. In allen Versuchen kamen 1:10-Normalserumverdünnungen zur Anwendung.

Versuchsanordnungen

Versuch 5) (R + L) 60' 56° (Standardkurve)

17) $\left[\left(N \begin{smallmatrix} 1:10 \\ \text{nativ} \end{smallmatrix} + L \right) 45' 37^{\circ} + R \right] 60' 56^{\circ}$ (Standardinhibitionskurve)

18) $\left[\left(N \begin{smallmatrix} 1:10 \\ \text{inakt.} \end{smallmatrix} + L \right) 45' 37^{\circ} + R \right] 60' 56^{\circ}$

23) $\left[\left(N \begin{smallmatrix} 1:10 \\ \text{nativ} \end{smallmatrix} + L \right) \begin{smallmatrix} 45' 37^{\circ} \\ 30' 56^{\circ} \end{smallmatrix} + R \right] 60' 56^{\circ}$

19) $\left[\left(N \begin{smallmatrix} 1:10 \\ \text{nativ} \end{smallmatrix} + L \right) 30' 56^{\circ} + R \right] 60' 56^{\circ}$

Besprechung der Ergebnisse

Es zeigt sich, daß die resultierende Inhibition keineswegs geringer sondern an Intensität zunimmt, wenn das Normalserum-Latexsuspensions-Gemisch ohne oder nach vorheriger Inkubation inaktiviert wird. Zwischen hitzelabilem Inhibitor und Reaktanten muß also eine Reaktion stattgefunden haben, die durch nachfolgende Inaktivierung nicht mehr rückgängig gemacht wird. Die Reaktion scheint sehr schnell abzulaufen, da in Versuch 19, der die sofortige Inaktivierung des Gemisches von Normalserum und Latexsuspension vorsieht, eine fast ebenso starke Hemmung wie in Versuch 23 erzielt wurde, in dem es erst nach Inkubation des Gemisches für 45 Minuten bei 37°C zur anschließenden Inaktivierung kommt. Es muß also doch angenommen werden, daß der hitzelabile Inhibitor mit dem Reaktanten reagiert und dort Stellen besetzt, mit denen der RF dann nicht mehr reagieren kann. Diese Frage war unter Fragestellung 4 aufgeworfen worden. Es muß noch untersucht werden, ob auch eine Reaktion zwischen Inhibitor und RF möglich ist.

Fragestellung 6

Diese Versuche sollten der Beantwortung der Frage dienen, ob auch eine Reaktion zwischen hitzelabilem Inhibitor und RF möglich ist. In Analogie zur Versuchsanordnung in Fragestellung 5 wurde die Mischung von nativem Normalserum und Rheumaseraum nach oder ohne vorherige Inkubation inaktiviert (30 Minuten, 56°C) und erst dann die Latexsuspension hinzugefügt. Zum Vergleich wurde neben einer Standardagglutinationskurve und einer Standardinhibitionskurve der Versuch 20 herangezogen, der mit gleicher Versuchsanordnung jedoch ohne Inaktivierung der Normalserum-Rheumatikerserum-Mischung erzielt wurde. Eine Versuchsanordnung, bei der vor Zugabe der Latexsuspension inaktiviertes Normalserum mit Rheumatikerserum inkubiert wird, wurde außerdem in die Diskussion eingeschlossen. Hierbei ist der thermolabile Inhibitor also mit Sicherheit inaktiviert. Es wurden ausschließlich 1:10-Normalserumverdünnungen verwendet.

Versuchsanordnungen:

Versuch 5) (R + L) 60' 56° (Standardkurve)

- 17) [(N 1:10_{nativ} + L) 45' 37° + R] 60' 56° (Standardinhibitionskurve)
- 20) [(N 1:10_{nativ} + R) 45' 37° + L] 60' 56°
- 21) [(N 1:10_{nativ} + R) 45' 37°_{30' 56°} + L] 60' 56°
- 22) [(N 1:10_{inaktiv.} + R) 45' 37° + L] 60' 56°

Besprechung der Ergebnisse

Nach den Versuchsergebnissen nimmt die Inhibition nach Inaktivierung des Gemisches aus Normal- und Rheumatikerserum vor Zugabe der Latexsuspension nicht ab. Dieser Tatbestand läßt vermuten, daß der hitzelabile Inhibitor sowohl mit den Latex-Partikeln als auch mit dem RF reagieren kann. Wenn der thermolabile Inhibitor nur mit dem Reaktanten reagieren könnte, so müsste

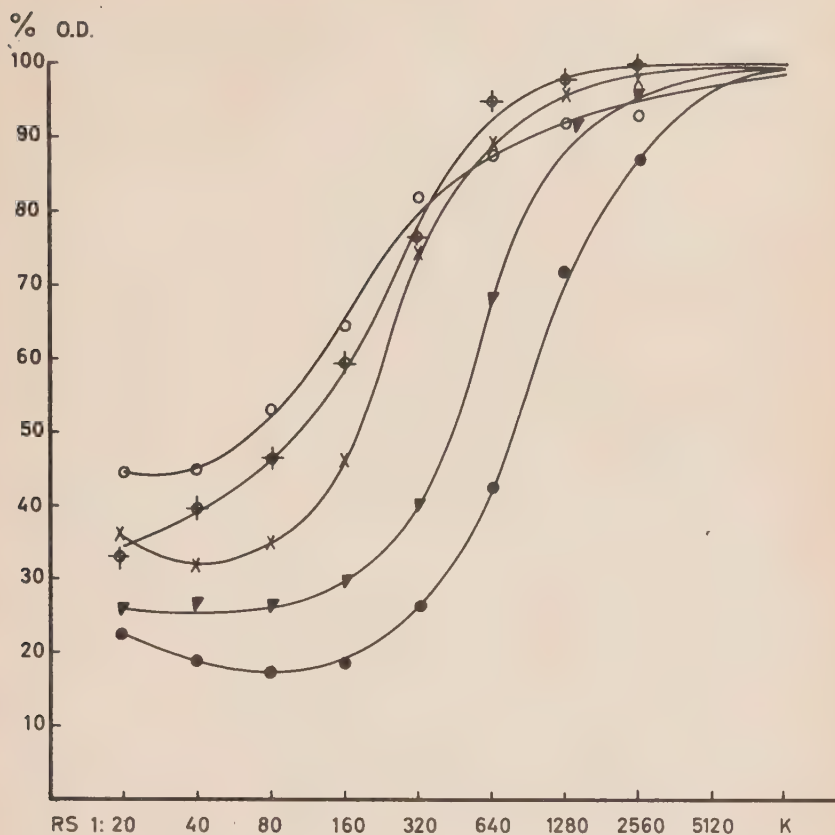


Abb. IX: Versuchsanordnungen zu Fragestellung 6

● = (R + L) 60' 56°

× = [(N^{1:10}_{nativ} + L) 45' 37° + R] 60' 56°

⊕ = [(N^{1:10}_{nativ} + R) 45' 37° + L] 60' 56°

○ = [(N^{1:10}_{nativ} + R) 45' 30' 56° + L] 60' 56°

▼ = [(N^{1:10}_{inakt.} + R) 45' 37° + L] 60' 56°

die Inhibitionsstärke deutlich geringer werden, da in diesem Fall ja der thermolabile Inhibitor durch die einleitende Inaktivierung der Mischung aus Normal- und Rheumatikerserum zerstört würde.

Fragestellung 7

Durch Gegenüberstellung bestimmter Versuche sollte gezeigt werden, welcher Anteil der Inhibitionsaktivität vermutlich der Wirkung eines hitzestabilen Inhibitors zuzuschreiben ist. Nur so kann gezeigt werden, daß der hitzelabile Inhibitor mit Sicherheit mit dem RF reagieren kann. Es wurden, abgesehen von einer Standardagglutinationskurve, in allen Fällen zunächst Mischungen von nativem bzw. inaktiviertem Normalserum (Verdünnung 1:10) und Rheumatikerserum vor Zugabe der Latexsuspension inkubiert.

Versuchsanordnungen:

Versuch 5) (R + L) 60' 56° (Standardkurve)

$$20) \left[\left(\begin{matrix} \text{N } 1:10 \\ \text{nativ} \end{matrix} + \text{R} \right) 45' 37^{\circ} + \text{L} \right] 60' 56^{\circ}$$

$$21) \left[\left(\begin{matrix} \text{N } 1:10 \\ \text{nativ} \end{matrix} + \text{R} \right) \begin{matrix} 45' \\ 30' \end{matrix} \begin{matrix} 37^{\circ} \\ 56^{\circ} \end{matrix} + \text{L} \right] 60' 56^{\circ}$$

$$22) \left[\left(\begin{matrix} \text{N } 1:10 \\ \text{inakt.} \end{matrix} + \text{R} \right) 45' 37^{\circ} + \text{L} \right] 60' 56^{\circ}$$

Besprechung der Ergebnisse

Nach Inkubation der Mischung von inaktiviertem Normalserum und Rheumatikerserum und anschließender Zugabe von Latexsuspension wird die Inhibition deutlich schwächer gegenüber den Versuchen, bei denen erst nach Mischung von nativem Normalserum mit Rheumatikerserum inaktiviert wurde. Diese Ergebnisse lassen den Schluß zu, daß der hitzelabile Inhibitor mit dem RF reagierte.

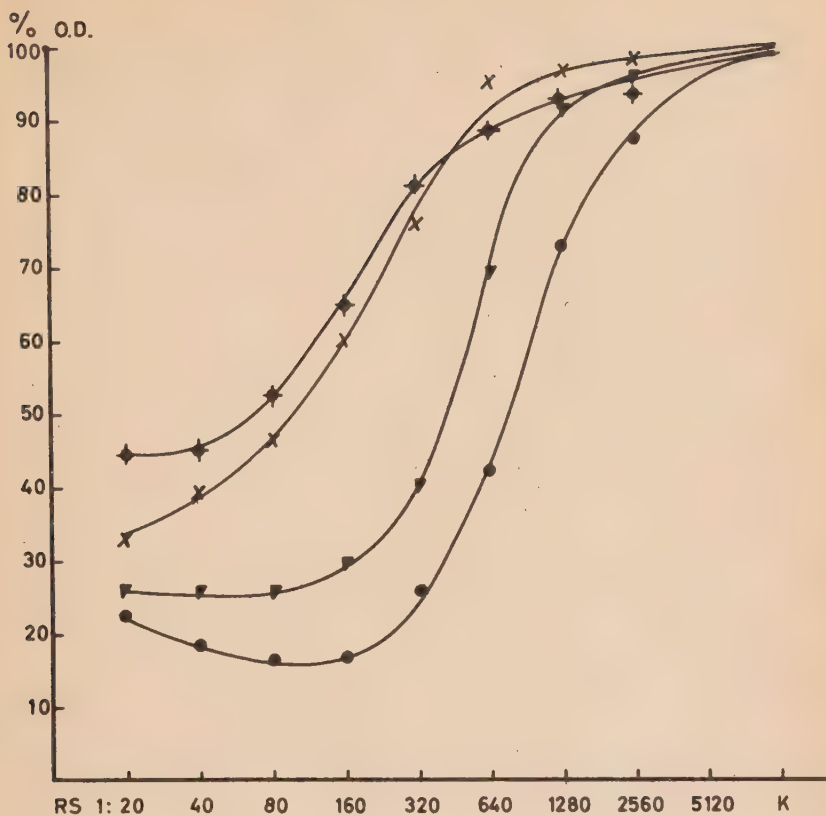


Abb. X: Versuchsanordnungen zu Fragestellung 7

● = (R + L) 60' 56°

× = [(N 1:10 nativ + R) 45' 37° + L] 60' 56°

◆ = [(N 1:10 nativ + R) 45' 37° 30' 56° + L] 60' 56°

▼ = [(N 1:10 inakt. + R) 45' 37° + L] 60' 56°

Fragestellung 8

In diesem und dem folgenden Abschnitt soll die Reaktionsweise des hitzestabilen Inhibitors diskutiert werden. Der Inhibitionskurve mit nativem Normalserum wurden zwei Versuche gegenübergestellt, bei denen zuerst Latexsuspension bzw. Rheumatikerserum mit inaktiviertem Normalserum einer Inkubation unterzogen wurde, bevor die Zugabe des Rheumatikerserums bzw. der Latexsuspension erfolgte.

Versuchsanordnungen:

Versuch 5) (R + L) 60' 56° (Standardkurve)

$$17) \left[\left(\begin{array}{c} \text{N } 1:10 \\ \text{nativ} \end{array} + \text{L} \right) 45' 37^{\circ} + \text{R} \right] 60' 56^{\circ}$$

$$18) \left[\left(\begin{array}{c} \text{N } 1:10 \\ \text{inakt.} \end{array} + \text{L} \right) 45' 37^{\circ} + \text{R} \right] 60' 56^{\circ}$$

$$22) \left[\left(\begin{array}{c} \text{N } 1:10 \\ \text{inakt.} \end{array} + \text{R} \right) 45' 37^{\circ} + \text{L} \right] 60' 56^{\circ}$$

Besprechung der Ergebnisse

Schon frühere Versuche hatten zu dem Ergebnis geführt, daß eine Inaktivierung des Normalserums bzw. die Zerstörung des aktiven hitzelabilen Inhibitors eine wesentliche Abschwächung der Inhibition nach sich zieht. Diese Versuche haben gezeigt, daß auch bei unterschiedlicher Reihenfolge der Zugabe der Reaktionspartner dieser Tatbestand bestätigt wird. Es besteht die Möglichkeit, daß die inhibitorische Aktivität des hitzestabilen Inhibitors etwas deutlicher wird, wenn man zunächst Normalserum mit Latexsuspension reagieren läßt. Über die wahrscheinliche Reaktionsweise des hitzestabilen Inhibitors kann mit diesen Versuchsergebnissen zunächst nichts ausgesagt werden.

Fragestellung 9

Schon in früheren Versuchen wurde beobachtet, daß die inhibitorische Potenz des Nativserums etwas deutlicher zum Ausdruck

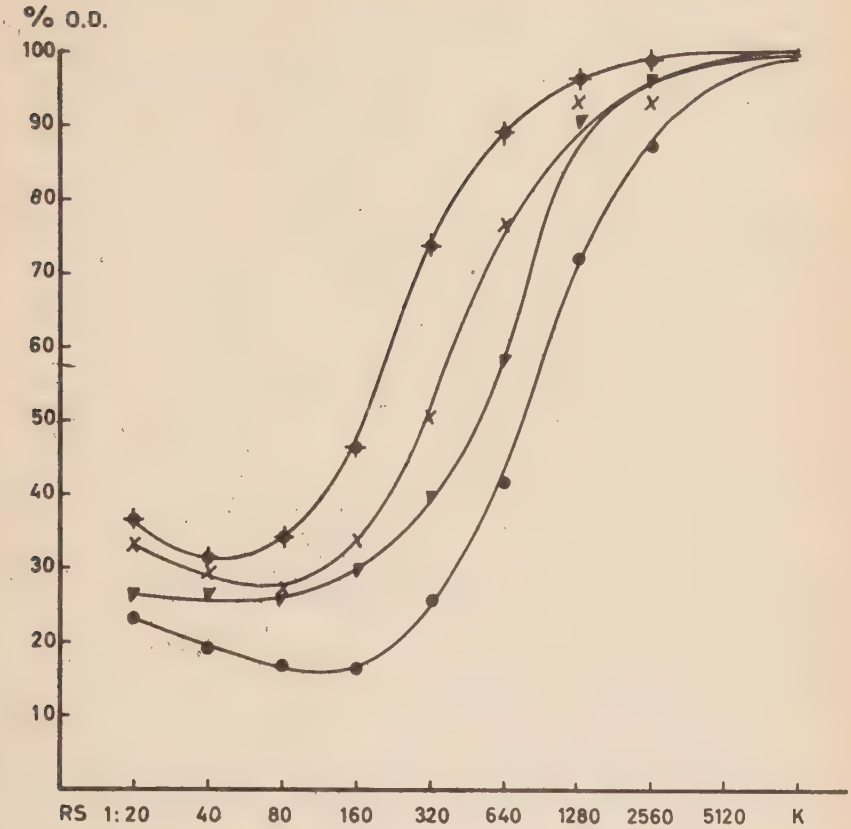


Abb. XI: Versuchsanordnungen zu Fragestellung 8

● = (R + L) 60' 56°

◆ = [(N_{nativ} 1:10 + L) 45' 37° + R] 60' 56°

× = [(N_{inakt.} 1:10 + L) 45' 37° + R] 60' 56°

▼ = [(N_{inakt.} 1:10 + R) 45' 37° + L] 60' 56°

kommt, wenn es nach erfolgter Mischung mit der Latexsuspension durch Erhitzen inaktiviert wird. Die entsprechenden Ergebnisse werden vergleichsweise herangezogen. Außerdem wird diskutiert, ob die Erhitzung des Gemisches aus nativem Normalserum und Rheumatikerserum vor Zugabe der Latexsuspension eine eventuelle Verstärkung der inhibitorischen Aktivität bewirkt.

Versuchsanordnungen:

Versuch 5) (R + L) 60' 56° (Standardkurve)

$$17) [(N \begin{smallmatrix} 1:10 \\ \text{nativ} \end{smallmatrix} + L) 45' 37^{\circ} + R] 60' 56^{\circ}$$

$$19) [(N \begin{smallmatrix} 1:10 \\ \text{nativ} \end{smallmatrix} + L) 30' 56^{\circ} + R] 60' 56^{\circ}$$

$$20) [(N \begin{smallmatrix} 1:10 \\ \text{nativ} \end{smallmatrix} + R) 45' 37^{\circ} + L] 60' 56^{\circ}$$

$$21) [(N \begin{smallmatrix} 1:10 \\ \text{nativ} \end{smallmatrix} + R) \begin{smallmatrix} 45' 37^{\circ} \\ 30' 56^{\circ} \end{smallmatrix} + L] 60' 56^{\circ}$$

$$23) [(N \begin{smallmatrix} 1:10 \\ \text{nativ} \end{smallmatrix} + L) \begin{smallmatrix} 45' 37^{\circ} \\ 30' 56^{\circ} \end{smallmatrix} + R] 60' 56^{\circ}$$

Besprechung der Ergebnisse

Es zeigt sich, daß die inhibitorische Aktivität des Normalserums nach erfolgter Reaktion mit dem Reaktant (vor Zugabe des Rheumatikerserums) deutlich verstärkt wird, wenn das Gemisch inaktiviert wird. Dieses Ergebnis spricht einmal dafür, daß zumindest der hitzelabile Inhibitor mit dem Reaktanten reagiert, zum anderen scheint es möglich, daß durch Erhitzen der Normalserum-Latexsuspensions-Mischung eine zusätzliche inhibitorische Potenz aktiviert wurde. Es könnte sich hier um den sogenannten "hitze stabilen" Inhibitor handeln, der nach Deicher (58) im Gammaglobulinbereich zu suchen ist. Danach würde also natives Normalserum nur einen oder mehrere hitzelabile Inhibitoren enthalten aber keinen "hitze stabilen" Inhibitor, der erst durch Erhitzen auf 56°C aktiviert würde. Es ist bekannt, daß der Rheumafaktor auch mit Gammaglobulin reagiert, ohne daß es einer Anlagerung an Trägersubstanzen bedarf.

Voraussetzung allerdings ist, daß dieses Gammaglobulin eine Veränderung z.B. durch Erhitzen erfährt (22, 60, 61), wodurch es in einen aggregierten Zustand übergeht. In unserem Falle könnten im Normalserum durch Erhitzen Aggregate entstehen, die durch Reaktion mit dem Rheumafaktor zu einer Präzipitation führen und so den beladenen Latex-Partikeln einen Teil der RF-Mengen entziehen. Wenn diese Behauptung richtig ist, wäre nur eine Reaktion des "hitzestabilen" Inhibitors mit dem RF und nicht mit den Latex-Partikeln möglich. Die aus dem Inaktivierungsprozess resultierende "Inhibition" durch den "hitzestabilen" Inhibitor ist relativ gering (siehe Fragestellung 3 und 7). Wenn also der "hitzestabile" Inhibitor erst durch Aggregation nach erfolgter Reaktion des hitzelabilen Inhibitors entsteht, dann müsste die durch den hitzelabilen Inhibitor verursachte Inhibition etwa um den Betrag der inhibitorischen Aktivität des "hitzestabilen" Inhibitors zunehmen. Unsere Ergebnisse bestätigen dies, jedoch nur für den Fall der Erhitzung des Gemisches von Normalserum und Latexsuspension vor Zugabe des Rheumatikerserums. Dagegen ist nach Erhitzen der Mischung von Normal- und Rheumatikerserum vor Zugabe der Latexsuspension eine wesentliche Zunahme der Inhibitionsaktivität nicht festzustellen. Die oben erwähnte Hypothese von der Entstehungsmöglichkeit des "hitzestabilen" Inhibitors vorausgesetzt, ist dies nur so zu deuten, daß der "hitzestabile" Inhibitor nach abgelaufener Reaktion des hitzelabilen Inhibitors mit dem RF keinen wesentlichen inhibitorischen Einfluß mehr entfalten kann, einmal weil der "hitzestabile" Inhibitor weniger wirksam ist, zum anderen da sich nur noch geringe vom hitzelabilen Inhibitor unbesetzte RF-Mengen vorfinden. Dem gegenüber könnte bei der Reaktion zwischen hitzelabilem Inhibitor und beladenen Latex-Partikeln bei nachfolgender Zugabe des Rheumatikerserums der durch Erhitzen entstandene "hitzestabile" Inhibitor wirksam werden und noch genügende Rheumafaktormengen vorfinden, die nicht mit hitzelabilem Inhibitor besetzt sind. Dies ist allerdings nur ein Erklärungsversuch. Im Falle der Entstehung des sogenannten "hitzestabilen" Inhibitors durch Aggregation von Gammaglobulin wäre seine Existenz im Normalserum fraglich. Der "hitzestabile" Inhibitor würde dann

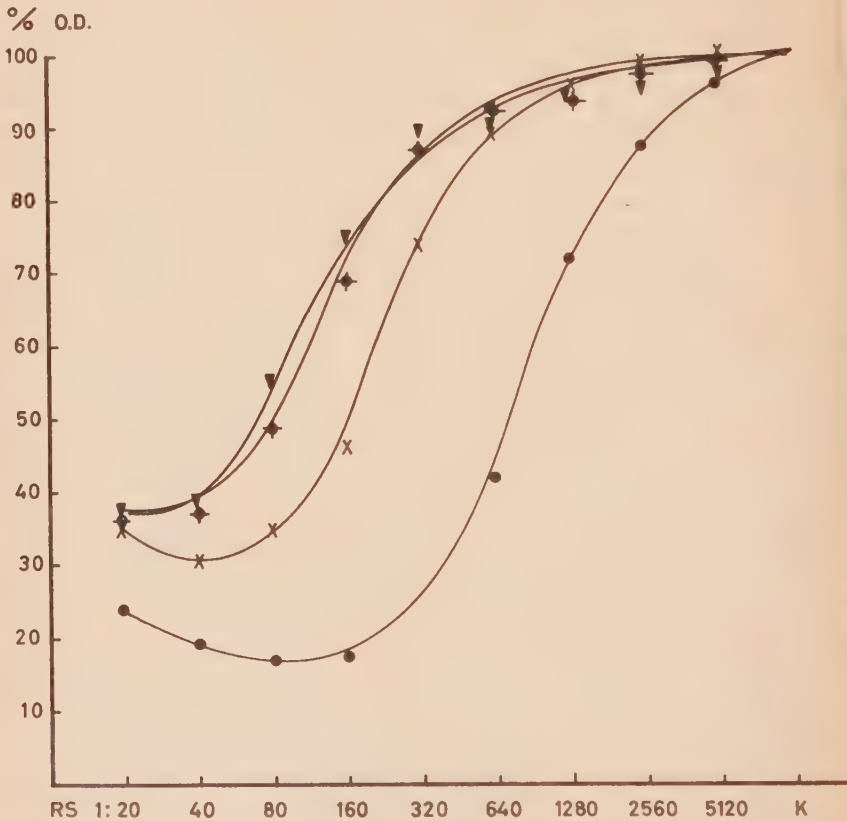


Abb. XII: Versuchsanordnungen zu Fragestellung 9

● = (R + L) 60' 56°

X = [(N 1:10 nativ + L) 45' 37° + R] 60' 56°

◆ = [(N 1:10 nativ + L) 30' 56° + R] 60' 56°

▼ = [(N 1:10 nativ + L) 45' 37° 30' 56° + R] 60' 56°

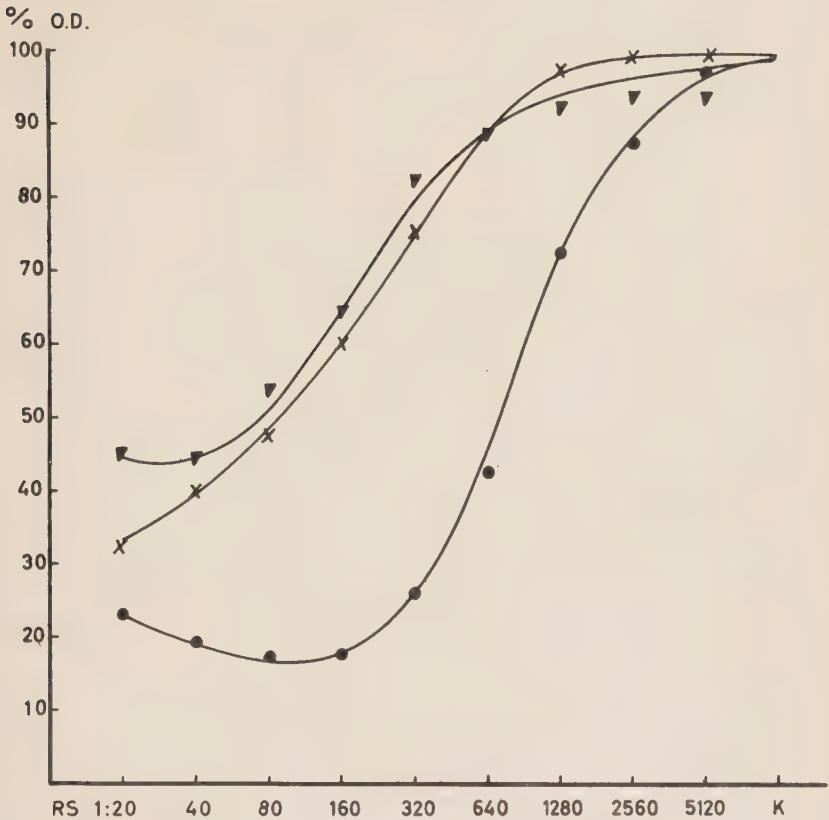


Abb. XIII: Versuchsanordnungen zu Fragestellung 9

● = (R + L) 60' 56°

X = [(N 1:10 nativ + R) 45' 37° + L] 60' 56°

▼ = [(N 1:10 nativ + R) 45' 30' 56° + L] 60' 56°

nur einen zusätzlichen Reaktanten zu den beladenen Latex-Partikeln darstellen.

D i s k u s s i o n

Die Versuche haben ergeben, daß die Modifikation des Latex-Fixationstests nach B e r n h a r d (59) eine geeignete Methode darstellt, um den Agglutinationsgrad der mit Cohn-Fraktion-II beladenen Latex-Partikel (Reaktant) nach erfolgter Reaktion mit dem RF (Reaktor) indirekt durch Messung der optischen Dichte zu erfassen. Außerdem konnte man mit dieser Methode Anhaltspunkte über den Einfluß der in Normalseren vorhandenen Inhibitoren auf die Reaktor-Reaktant-Bindung gewinnen. Bei Verwendung von nativem Normalserum in einer Verdünnung von 1:10 bzw. 1:5 wurde eine deutliche Inhibition festgestellt, wenn zunächst Normalserum mit Latexsuspension bzw. Rheumatiker-serum inkubiert wurde. Aus einer Zugabe von Normalserum zum Reaktor-Reaktant-Gemisch resultierte keine oder nur eine sehr unwesentliche Inhibition. Nach erfolgter Reaktion zwischen Reaktor und Reaktant sind vermutlich zumindest teilweise die Stellen auf den beladenen Latex-Partikeln durch Reaktion mit dem Rheumafaktor-Makroglobulin besetzt und für eine nachfolgende Besetzung mit dem hitzelabilen Inhibitor blockiert. Nach Inaktivierung des Normalserums für 30 Minuten bei 56°C war ein deutlicher Rückgang der inhibitorischen Aktivität festzustellen. Diese Tatsache wurde der Zerstörung eines thermolabilen Inhibitors zugeschrieben. Dieser Befund bestätigt die Versuche von B e r n h a r d (59) nur teilweise, der nach Inaktivierung der Normalseren einen völligen Rückgang der inhibitorischen Potenz fand. Zu bemerken ist allerdings, daß der Autor das Normalserum in einer Verdünnung von 1:20 verwandte.

Weiter konnte gezeigt werden, daß sowohl die Inaktivierung des Gemisches aus Normalserum und Rheumatiker-serum bzw. Latexsus-

pension nach oder ohne Inkubation keinen Verlust der inhibitorischen Aktivität bewirkte. Die Reaktion zwischen Normalserum und Rheumatikerserum bzw. Latex-Partikeln muß also sehr schnell abgelaufen sein und kann durch nachfolgende Inaktivierung nicht mehr rückgängig gemacht werden. Diese Tatsache läßt vermuten, daß der hitzelabile Inhibitor sowohl mit Reaktant als auch mit Reaktor reagieren kann. Dies widerspricht der Theorie von B e r n h a r d (59), der eine alleinige Reaktion zwischen dem Inhibitor des nativen Normalserums und den Latex-Partikeln annimmt. Nach Inaktivierung des Gemisches von Normalserum und Latexsuspension wurde gegenüber der gleichen Versuchsanordnung mit einfacher Inkubation von 45' bei 37°C eine Verstärkung der Inhibition festgestellt. Dieses Versuchsergebnis wurde der Wirkung eines durch den Inaktivierungsprozess entstandenen "hitzestabilen" Inhibitors zugeschrieben. Das würde bedeuten, daß der hitzestabile Inhibitor nichts anderes als aggregiertes Gammaglobulin darstellt und seine Existenz im nativen Normalserum zumindest fragwürdig ist.

Z u s a m m e n f a s s u n g

Es wurden unter Verwendung eines auf der Messung der optischen Dichte des Überstandes der nicht agglutinierten Latex-Partikel beruhenden Latex-Fixationstests die Einflüsse der inhibitorischen Potenz des Normalserums auf die agglutinierende Fähigkeit eines Rheumatiker-Referenzserums untersucht. Es ergab sich, daß ein hitzelabiler Inhibitor existiert, der sowohl mit auf der Latex-Oberfläche aggregiertem Gammaglobulin (Reaktant) als auch mit Rheumafaktor (Reaktor) reagiert. Die Komplementnatur dieses Inhibitors wird diskutiert. Daneben findet sich in inaktivierten Seren ein sogenannter hitzestabiler Inhibitor, der vermutlich nicht als echter Inhibitor anzusehen ist, da er erst durch Aggregation normaler Gammaglobuline entsteht. Als aggregiertes Gammaglobulin wirkt er wie Reaktant und abstrahiert

Rheumafaktor von seiner Reaktion mit beladenen Latex-Partikeln. Außerdem ist die inhibitorische Wirkung unaggregierten Gamma-globulins in großem Überschuß zu diskutieren, das bereits gebildete Präzipitationen wieder lösen kann.

Literaturverzeichnis

- 1) Meyer, K.: Zschr. f. Immun.-Forsch. 34, 229 (1922)
- 2) Waaler, E.: Acta path. microbiol. scand. 17, 172 (1940)
- 3) Rose, H.M., Ragan, C., Pearce, E. u. Lipmann, M.O.: Proc. Soc. exp. Biol. 68, 1 (1948)
- 4) Svartz, N. u. Schlossmann, K.: Nord. Med. Tskr. 42, 1390 (1949)
- 5) Heller, G., Jacobson, A.S. u. Kolodny, M.H.: Proc. Soc. exp. Biol. 72, 316 (1949)
- 6) Svartz, N. u. Schlossmann, K.: Ann. Rheum. Dis. 14, 191 (1955)
- 7) Wager, O.: Ann. Med. exp. biol. Fenn. 28 (1950), Suppl. 8
- 8) Heller, G., Jacobson, A.S., Kolodny, M.H. u. Schuman, R.L.: J. Immunol. 69, 27 (1952)
- 9) Svartz, N. u. Schlossmann, K.: Acta Med. scand. 149, 83 (1954)
- 10) Svartz, N.: Sd. aus d. Bull. d. Schweiz. Akad. d. Med. Wissenschaften Vol. 18, 1 (1962)
- 11) Ziff, M., Brown, P., Lospalluto, J., Badin, J. u. Mc Ewen, C.: Amer. J. Med. 20, 500 (1956)
- 12) Heller, G., Jacobson, A.S., Kolodny, M.H. u. Kammerer, W.H.: J. Immunol. 72, 66 (1954)
- 13) Epstein, W.V., Engleman, E.P. u. Ross, M.: J. Immunol. 79, 441 (1957)
- 14) Singer, J.M. u. Plotz, C.M.: Amer. J. Med. 21, 888 (1956)
- 15) Singer, J.M. u. Plotz, C.M.: J. Amer. Med. Ass. 168, 180 (1958)
- 16) Rheins, M.S., Mc Coy, F.W., Burell, R.G. u. Buehler, E.V.: J. Clin. Med. 50, 113 (1957)
- 17) Feldmann, H. u. Mitarb.: Arch. inter. Med. 101, 425 (1958)
- 18) Wiedermann, G., Egghardt, F. u. Braunsteiner, H.: Zschr. Rheumaforsch. 17, 314 (1958)
- 19) Bozicewich, J., Bunim, J.J., Freund, J. u. Ward, S.B.: Proc. Soc. exp. Biol. 97, 180 (1958)
- 20) Zavázal, V.: Zschr. Rheumaforsch. 17, 41 (1958)
- 21) Winblad, St.: Acta Rheum. scand. 9, 81 (1963)

- 22) Kleine, N., Müller, W. u. Matthes, E.: Zschr. Rheumaforsch. 17, 206 (1958)
- 23) Miehle, K. u. Puttnins, T.: Zschr. Rheumaforsch. 18, 372 (1959)
- 24) Schierz, G.: Zschr. Rheumaforsch. 21, 162 (1962)
- 25) Hall, A.P., A.D. Medins u. T.B. Bayles: New Engl. J. Med. 258, 731 (1958)
- 26) Deicher, H., Kirchberg, G., Behrend, T. u. Fricke, R.: Klin. Wschr. 40, 167 (1962)
- 27) Mathies, H., Fladerer, M.: Sd. aus Dtsch. med. Wschr. 88 2391 (1963)
- 28) Ernst, O.: Münchn. med. Wschr. 44, 2185 (1963)
- 29) Heller, G., Kolodny, M.H., Lepow, L.H., Jacobson, A.S., Rivera, M.E. u. Marks, G.H.: J. Immunol. 74, 340 (1955)
- 30) Müller-Eberhard, H.J., Kunkel, H.G. u. Franklin, E.C.: Proc. Soc. exp. Biol. 93, 146 (1956)
- 31) Müller-Eberhard, H.J.: Dtsch. Med. Wschr. 84, 719 (1959)
- 32) Franklin, E.C., Holman, H.R., Müller-Eberhard, H.J. u. Kunkel, H.G.: J. exp. Med. 105, 425 (1957)
- 33) Franklin, E.C., Kunkel, H.G., Müller-Eberhard, H.J. u. Holman, H.R.: Ann. Rheum. Dis. 16, 315 (1957)
- 34) Kunkel, H.G.: Arthritis and Rheumatism 6, 414 (1963)
- 35) Svartz, N.: Sd. aus Dtsch. Med. J. 13 (1962)
- 36) Wöhler, F., Müller, W. u. Hofmann, A.: Zschr. Rheumaforsch. 19, 85 (1960)
- 37) Behrend, T. u. Cleve, H.: Zschr. Rheumaforsch. 19, 121 (1960)
- 38) Imre, I.: Immunoelktrophoretische Untersuchungen bei chronischer Polyarthritits. V. European Kongress on Rheumatic Dis. Stockholm 25.-28.8.1963
- 39) Mathies, H., Imre, I. u. Schüle, V.: Zschr. Rheumaforsch. 22, 183 (1963) I. Mitt.
- 40) Imre, I. u. Mathies, H.: Zschr. Rheumaforsch. im Druck
- 41) Edelmann, G.M., Kunkel, H.G. u. Franklin, E.C.: J. exp. Med. 108, 105 (1958)
- 42) Vaughan, J.H.: zit. Müller-Eberhard, H.J.: Dtsch. Med. Wschr. 84, 719 (1959)
- 43) Singer, J.: zit. Edelmann, G.M., Kunkel, H.G. u. Franklin, E.C.: J. exp. Med. 108, 105 (1958)

- 4) Morton, J.I. u. Deutsch, H.F.: zit. Edelmann, G.M., Kunkel, H.G. u. Franklin, E.C.: J. exp. Med. 108, 105 (1958)
- 5) Robecchi, A. u. Daneo, V.: Acta Rheum. scand. 5, 245 (1959)
- 6) Christ, P., Vanek, E., Schiessl, R., Krachudel, K.H. u. Becker, H.J.: Zschr. Rheumaforsch. 20, 81 (1961)
- 7) Kunkel, H.G. u. Fudenberg, H.H.: zit. Dtsch. Med. Wschr. 87, S. 887-894 (1962)
- 8) Lerner, E.M., Bloch, K.J. u. Williams, R.R.: Arthr. and Rheumatism 3, 26 (1960)
- 9) Vaughan, J.H. u. Waller, M.V.: zit. Edelmann, G.M., Kunkel, H.G. u. Franklin, E.C.: J. exp. Med. 108, 105 (1958)
- 10) Christian, Ch.L.: J. exp. Med. 108, 139 (1958)
- 11) Deicher, H. u. Behrend, T.: Zschr. Rheumaforsch. 20, 119 (1961)
- 12) Brine, K.L., Wedgwood, R.J. u. Clark, W.S.: zit. Schubart, A.F., Cohen, A.S., Calkins, E.: New Engl. J. Med. 261, 363 (1959)
- 13) Schubart, A.F. u. Calkins, E.: zit. Hall, A.P., Bardawil, W.A., Medins, A.D. u. Bayles, T.B.: Arthr. and Rheumatism 2, 61 (1959)
- 14) Schubart, A.F., Cohen, A.S. u. Calkins, E.: New Engl. J. Med. 261, 363 (1959)
- 15) Schubart, A.F.: New Engl. J. Med. 261, 579 (1959)
- 16) Rantz, L.A., Randall, E. u. Kettner, D.: Arthr. and Rheumatism 2, 104 (1959)
- 17) Franklin, E.C.: zit. Deicher, H.: Klin. Wschr. 39, 612 (1961)
- 18) Deicher, H.: Klin. Wschr. 39, 612 (1961)
- 19) Bernhard, G.C., Cheng, W., Talmage, D.W.: J. Immunol. 88, 750 (1962)
- 20) Epstein, W.V., Johnson, A. u. Ragan, C.: Proc. Soc. exp. Biol. 91, 235 (1956)
- 21) Müller, W., Haftstein, F.: Zschr. Klin. Med. 156, 154 (1959)

Lebenslauf

Am 29.1.1935 wurde ich als Sohn des Dipl.-Ing. Bernd Helming und seiner Frau Anneliese, geb. Vienenkötter, in Beckum/Westf. geboren. Nach Absolvierung der Volksschule besuchte ich die Gymnasien in Beckum und Ahlen. Das Abitur bestand ich im März 1957 am neusprachlichen Gymnasium in Ahlen.

Im Sommersemester 1957 begann ich mit dem Studium der Medizin an der Universität Tübingen. Zum Sommersemester 1958 wechselte ich zur Universität Freiburg über und bestand dort am 30.10.1958 das Physikum. Nach dem ersten klinischen Semester führte ich mein Studium an der Universität München fort und legte dort das Medizinische Staatsexamen am 27.2.1963 ab.

Am 1.5.1963 begann ich die Medizinalpraktikantenzeit an der Medizinischen Poliklinik der Universität München; während dieser Zeit arbeitete ich an der vorliegenden Dissertation. Seit dem 1.3.1964 arbeite ich auf der Chirurgischen Abteilung des Städtischen Krankenhauses des III. Ordens in München Nymphenburg als Medizinalassistent.

Herrn Professor Dr. W. Seitz danke ich für die Überlassung des Themas. Herrn Dr. H. Mathies sei besonders gedankt für die Überwachung und hilfsbereite Unterstützung während der Durchführung der Arbeit.

